



**HAL**  
open science

# Etudes structurale et fonctionnelle de la protéine Syk dans les cellules B de Leucémie Lymphoïde Chronique

Souleymane Harouna Rachidi Abdou

► **To cite this version:**

Souleymane Harouna Rachidi Abdou. Etudes structurale et fonctionnelle de la protéine Syk dans les cellules B de Leucémie Lymphoïde Chronique. Santé. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2024. Français. NNT : 2024PA131024 . tel-04715029

**HAL Id: tel-04715029**

**<https://theses.hal.science/tel-04715029v1>**

Submitted on 30 Sep 2024

**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.



**École doctorale Sciences, Technologies, Santé – Galilée**

---

**Études structurale et fonctionnelle de la protéine Syk dans les cellules B de  
Leucémie Lymphoïde Chronique**

---

**THÈSE DE DOCTORAT**

présentée par

**HAROUNA RACHIDI**

**Souleymane**

Laboratoire INSERM U978 – Université Sorbonne Paris Nord  
« Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B »

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE - BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

soutenue le Jeudi 30 Mai 2024 devant le jury d'examen constitué de :

<b>Pr Angela SUTTON</b>	Université Sorbonne Paris Nord	Présidente
<b>Dr Loredana SAVEANU</b>	Université Paris Cité	Rapporteuse
<b>Dr Laurent VALLAT</b>	Université de Strasbourg	Rapporteur
<b>Dr Peter COOPMAN</b>	Université de Montpellier	Examineur
<b>Dr Christine Le Roy</b>	Université Sorbonne Paris Nord	Directrice

## Résumé :

Le développement et la fonction des lymphocytes B dépendent de la cascade de signalisation du récepteur à l'antigène (BCR), qui est médiée par la tyrosine kinase Syk. Les niveaux globaux de phosphorylation de Syk établissent un seuil de réponse au BCR dans les cellules B de la leucémie lymphoïde chronique primaire (LLC), qui est associé à leur avantage de survie et à la progression de la maladie. Le statut de phosphorylation de Syk affecte ses états conformationnels et son activité, ce qui suggère que les réponses cellulaires dépendantes de Syk sont influencées par ses différentes conformations. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons identifié des profils de phosphorylation de Syk distincts entre deux groupes fonctionnels d'échantillons de LLC, confirmant l'importance des différentes fonctions de Syk dans la capacité de signalisation des cellules de LLC. L'analyse des effets des mutants de phosphorylation de Syk sur différentes voies de signalisation émanant de l'activation du BCR dans les cellules LLC, y compris l'activité métabolique ou l'expression des cytokines et des chimiokines, a mis en évidence l'existence de résidus tyrosine spécifiques de Syk. Nous avons identifié un ensemble de résidus essentiels au processus d'activation de la kinase, ainsi que des résidus impliqués dans la liaison de Syk à ses partenaires, pour la régulation de la survie et des fonctions sécrétoires des cellules B de LLC. Collectivement, nos résultats apportent de nouveaux éléments sur les divers rôles de Syk dans la pathogenèse de la LLC.

**Mots clés :** lymphocyte B ; signalisation du BCR ; Syk ; phosphorylation ; cancer

## Abstract:

B-cell development and function depend on the antigen receptor signaling (BCR) cascade, which is mediated by the tyrosine kinase Syk. Global levels of Syk phosphorylation establish a threshold for BCR response in primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells, which is associated with their survival advantage and disease progression. The phosphorylation status of Syk affects its conformational states and activity, suggesting that Syk-dependent cellular responses are influenced by its different conformations. In my thesis work, we identified distinct Syk phosphorylation profiles between two functional groups of CLL samples, confirming the importance of different Syk functions in the signaling capacity of CLL cells. Analysis of the effects of Syk phosphorylation mutants on different signaling pathways emanating from BCR activation in CLL cells, including metabolic activity or cytokine and chemokine expression, highlighted the importance of Syk-specific tyrosine residues. A set of residues essential to the kinase activation process and residues involved in Syk binding to its partners for the regulation of cell survival and secretory functions in CLL B cells were identified. Collectively, these results provide new insights into the various roles of Syk in the pathogenesis of CLL.

**Keywords:** B lymphocyte; BCR signaling; Syk; phosphorylation; cancer

## Remerciements :

J'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet de thèse.

Je tiens à présenter mes sincères remerciements au **Pr Angela SUTTON**, d'avoir accepté de présider mon jury. Je remercie les **Dr Loredana SAVEANU** et **Dr Laurent VALLAT** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon manuscrit. Je remercie également le **Dr Peter COOPMAN** d'avoir accepté d'être examinateur et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit.

A ma directrice de thèse, **Dr Christine LE ROY**, merci de m'avoir pris sous ton aile depuis mon Master 2 et d'avoir eu confiance en moi pour continuer ce travail d'encadrement durant toute ma thèse. A l'issue de ce parcours avec toi, j'ai acquis une méthodologie de travail centrée sur la rigueur qui me sera utile dans la poursuite de mes objectifs futurs. Je te souhaite de la réussite avec pleins de publications.

Merci aux **Dr Lionel GUITTAT** et **Rofia Boudria** d'avoir cru en moi dès le Master 1 et de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le monde scientifique avec un stage de 3 mois.

Un grand merci à la directrice du laboratoire, **Docteur Nadine Varin-Blank** de m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis le Master 1 en 2018 jusqu'à la fin de ma thèse aujourd'hui. Ton aide, ta direction et le travail d'équipe au sein de l'unité U978 ont contribué à faire de moi le scientifique que je suis et m'auront résolument marqué et pour longtemps. Je te souhaite également beaucoup de réussite quel que soit tes futurs projets.

A **Feriel** et **Jordan** avec lesquels j'ai eu le plaisir de partager un bureau. C'était un plaisir de passer ces 3 années de thèse avec des esprits aussi attentionnés et aussi critiques que les vôtres. Merci d'avoir contribué à mes réflexions lors de mes analyses de données.

Merci à **Antonin, Stéphanie, Laure, Imane, Kocèila** pour le support technique et les débats aussi interminables qu'enrichissants lors de nos pauses café. Vous êtes les meilleurs.

Je tiens également à remercier particulièrement le **Dr Laura GARDANO**. Ton aide et tes conseils scientifiques ou en littérature m'ont été d'un grand apport.

Je remercie **ma famille, mon papa, ma maman, mes frères et sœurs et évidemment Aaliya,** pour m'avoir soutenu sans faille depuis le tout début. Je vous remercie pour vos conseils, votre réconfort, votre écoute, vos prières, votre patience et votre amour. Mes études, mes réflexions sur mon sujet de thèse ont souvent installé une distance entre nous. Je vous remercie pour votre compréhension. Je vous aime.

## Table des matières

Résumé : .....	2
Abstract: .....	2
Remerciements : .....	3
Table des matières .....	5
Abréviations .....	8
Liste des figures .....	11
Liste des tableaux .....	11
Introduction .....	12
Chapitre 1 : La protéine kinase Syk (Spleen Tyrosine Kinase) .....	12
I. Introduction.....	12
II. Les protéines kinases (PKs) .....	12
1. Les sérine/thréonine kinases (STKs) .....	14
2. Les tyrosines kinases.....	16
III. La protéine Syk : le gène.....	18
1. Apparition au cours de l'évolution .....	18
2. Epissage du gène de Syk : les isoformes de Syk.....	19
3. Structure primaire de la protéine Syk .....	20
4. Modifications post-traductionnelles.....	21
4.1. La phosphorylation.....	21
4.2. L'ubiquitinylation.....	23
5. Mécanismes d'activation de Syk .....	24
Chapitre 2 : Rôle de Syk dans la physiologie.....	27
I. Dans le développement prénatal .....	27
II. Dans l'homéostasie tissulaire .....	28
1. Syk dans les cellules hématopoïétiques .....	28
1.1. Les lymphocytes B .....	28
1.1.1. Hématopoïèse .....	28
1.1.1.1. Développement indépendant de l'antigène dans la moelle osseuse.....	29
1.1.1.2. Maturation dépendante de l'antigène : dans les organes lymphoïdes secondaires	31
1.1.2. Le BCR : Structure .....	33
1.1.3. Le BCR : Signalisation .....	34
1.1.3.1. Signalisation en aval du BCR .....	36
1.1.3.2. La voie PLC $\gamma$ 2-Calcium-NFAT.....	37
1.1.3.3. La voie PI3K-AKT .....	37
1.2. Les lymphocytes T .....	39

1.2.1.	Syk dans le développement des cellules T .....	39
1.2.2.	Syk dans la signalisation du TCR.....	40
1.3.	Syk avec les autres récepteurs à motifs ITAM.....	41
1.3.1.	Dans les cellules myéloïdes .....	42
1.3.2.	Dans les cellules non hématopoïétiques .....	44
Chapitre 3 : Syk et physiopathologie .....		47
I. Syk comme promoteur de tumeur.....		47
1. Surexpression et activation constitutive de Syk.....		47
1.1. Syk dans les voies de survie .....		51
<i>La survie médiée par MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)</i> .....		51
<i>La survie médiée par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)</i> .....		51
<i>La survie médiée par SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins)</i> .....		52
<i>La survie médiée par MYC</i> .....		52
1.2. Les autres voies de la survie.....		53
<i>La nucléoline</i> .....		53
<i>Les protéines de la famille STAT</i> .....		53
1.3. Syk et LLC .....		54
1.3.1. Dans les autres hémopathies B .....		56
1.4. Dérégulation fonctionnelle de Syk indépendante du BCR.....		58
1.4.1. Dans les cellules hématopoïétiques .....		58
1.4.2. Dans les cellules non hématopoïétiques .....		60
1.4.2.1. Rôle de Syk via les récepteurs à motifs ITAM .....		60
1.4.2.2. Rôle de Syk indépendant des récepteurs.....		61
2. Syk : Les protéines de fusion .....		62
3. Syk : les mutations activatrices .....		63
II. Syk suppresseur de tumeur.....		65
1. Dans les cellules hématopoïétiques.....		66
2. Dans les cellules non-hématopoïétiques .....		67
2.1. Dans les cellules épithéliales .....		67
2.1.1. Les carcinomes .....		67
2.1.2. Les mélanomes .....		70
2.2. Epissage alternatif et suppression de tumeur .....		70
Objectifs .....		72
Résultats : .....		74
Manuscrit 1 : Functional Impact of phospho-Syk mutants in B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia) .....		74
Manuscrit 2 : Regulatory interplay between Vav1, Syk and $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells.....		104

Discussion et perspectives.....	139
Bibliographie.....	147



## Abréviations

Abréviation	Signification
BCR	B-cell receptor
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
TCR	T-cell receptor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
MCL	Myeloid Cell Leukemia
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
MYC	Myelocytomatosis oncogene
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
IDA	Inter-Domaines A
IDB	Inter-Domaines B
SYK	Spleen tyrosine kinase
ZAP	Zeta-associated protein 70
GTP	Guanosine Triphosphate
PKA	Protéine Kinase A
STK	Serine/Threonine protein Kinase
DAG	Diacylglycérol
PKC	Protein kinase C
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKAPK	MAP Kinase Activated Protein Kinase
PKR	Protein kinase RNA-activated
RNA	Ribonucleic acid
IFN	Interferon
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
NRTK	Non-Receptor Tyrosine Kinases
PDGF	Platelet-derived growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ANK	Ankyrin
BLNK	B-cell linker
RMN	Nuclear Magnetic Resonance
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CLP	Common Lymphoid Progenitor
IL	Interleukin
RAG	Recombination-activating gene
SLC	Surrogate Light Chain
MZ	Marginal-zone
TNF	Tumor necrosis factor
BAFF	B-cell activating factor
DZ	Dark zone
LZ	Light zone
GC	Germinal centres
HEL	Hen Egg Lysozyme
PLC	Phospholipase C

BTK	Bruton's tyrosine kinase
ORAI	Calcium release-activated calcium channel protein
SOCE	Store-Operated Ca <sup>2+</sup> Entry
STIM	Stromal interaction molecules
BCAP	B-cell adaptor protein
TSC	Tuberous sclerosis protein complex
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
DP	Double Positive
SLP	SH2-domain-containing leukocyte protein
CLR	C-Type Lectin Receptors
GPVI	Glycoprotein VI
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
LPS	Lipopolysaccharides
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
LF	Lymphome folliculaire
LCM	Lymphome de la cellule du manteau
LZM	Lymphome de la zone marginale
PTCL	Peripheral T-cell lymphoma
PTLD	Post-transplant lymphoproliferative disease
LAM	Leucémie aigüe myéloïde
RAS	Rat sarcoma virus
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SCCHN	Squamous cell carcinoma of head and neck
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
NLC	Nucléoline
IGHV	Immunoglobulin heavy chain variable region genes
IGLV	Immunoglobulin lambda variable cluster
FL	Follicular lymphoma
MZL	Marginal Zone Lymphoma
WM	Waldenstrom macroglobulinemia
GCB	Germinal Center B-like
ABC	Activated B cell-like
EBV	Epstein-barr virus
MMTV	Mouse mammary tumor virus
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
PNT	Pointed
ITK	IL2 Inducible T Cell Kinase
SNP	Single nucleotide polymorphisms
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
LAL	Leucémie aigüe lymphoblastique
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
HCC	Hepatocellular carcinoma
PCR	Polymerase Chain Reaction
DCIS	Ductal carcinoma in situ
IDC	Invasive Ductal Carcinoma

URC	Unité de Recherche Clinique
SFK	Src Family Kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
WT	Wild-type
KD	Kinase-Dead
TGF	Transforming growth factor
MIP	Macrophage inflammatory protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor

## Liste des figures

Figure 1 : <b>Représentation schématique simplifiée du processus de signalisation cellulaire regroupant les différents acteurs mis en en jeu.</b> .....	13
Figure 2: <b>Mécanisme d'activation des RTKs.</b> .....	16
Figure 3 : <b>Représentation schématique de l'expression des membres de la famille des kinases Syk et de sa conservation au cours de l'évolution.</b> .....	18
Figure 4 : <b>Représentation schématique de la structure linéaire de Syk montrant ses domaines SH2 et catalytique séparés par les inter-domaines A (IDA) et B (IDB)</b> .....	21
Figure 5: <b>A) Représentation de la séquence de Syk. B) Modèle d'activation de Syk.</b> .....	21
Figure 6: <b>Mécanisme d'activation de Syk.</b> .....	24
Figure 7 : <b>Représentation schématique du développement des cellules B (Tergaonkar, 2022).</b> .....	29
Figure 8 : <b>Structure schématique du BCR et du pré-BCR.</b> .....	30
Figure 9 : <b>Structure du microenvironnement d'un centre germinale.</b> .....	32
Figure 10: <b>Structure du BCR associé à ses sous unité Iga/β (CD79A/B)</b> .....	33
Figure 11: <b>La voie de signalisation du BCR.</b> .....	35
Figure 12: <b>Modèle d'activation et de signalisation du TCR et du pré-TCR.</b> .....	40
Figure 13 : <b>Syk dans la signalisation des récepteurs à motifs ITAM dans les cellules hématopoïétiques</b> .....	42
Figure 14 : <b>Mécanismes de survie cellulaire favorisée par SYK et impliquant l'axe PI3K-AKT</b> .....	51
Figure 15: <b>Impact fonctionnel de l'expression de ZAP-70 dans la signalisation du BCR</b>	55
Figure 16: <b>Développement des cellules B et cellules à l'origine des hémopathies B.</b> .....	56

## Liste des tableaux

Tableau 1: <b>Liste des pathologies cancéreuses dans lesquelles Syk est un promoteur de tumeurs</b> .....	47
Tableau 2 : <b>Tableau récapitulatif des variants monoalléliques de Syk retrouvés chez les patients avec leurs caractéristiques cliniques</b> .....	63
Tableau 3 <b>Liste des pathologies cancéreuses dans lesquelles Syk agit comme suppresseur de tumeur</b> .....	65

# Introduction

## Chapitre 1 : La protéine kinase Syk (Spleen Tyrosine Kinase)

### I. Introduction

L'étude des protéines et de leurs fonctions est centrale dans la compréhension des mécanismes cellulaires complexes. Une famille de ces protéines, notamment celle des kinases, occupe une place importante dans la régulation des cascades de signalisation essentielles aux fonctions cellulaires. Les protéines à activité tyrosine et les sérine-thréonine kinases, qui constituent deux sous-familles de kinases, jouent des rôles spécifiques dans la modulation de ces voies de signalisation et aboutissent à diverses fonctions. Membre de la famille des tyrosine kinases et dotée d'une activité sérine/thréonine kinase, la protéine Syk est impliquée dans la transduction de nombreux signaux intracellulaire en réponse à des facteurs extrinsèques. Ses différentes fonctions dans la transduction de signal sont modulées par des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et/ou l'ubiquitination, qui peuvent induire des changements conformationnels. Ces modifications concernent aussi bien des résidus tyrosine que sérine et thréonine dont l'impact fonctionnel dans la propagation du signal peut révéler le lien entre la structure et la fonction des protéines kinases.

### II. Les protéines kinases (PKs)

Les eucaryotes évoluent dans des environnements complexes à partir desquels divers signaux (mécaniques, chimiques...) sont émis et influencent leur devenir/existence. Les protéines kinases (PKs) permettent la transduction intracellulaire de ces signaux par le biais de modifications post-traductionnelles, telle que la phosphorylation. Au cours de cette réaction chimique, les PKs transfèrent un groupement phosphate, généralement à partir de l'ATP ou du GTP, sur un substrat cible. Dans les cellules eucaryotes, la phosphorylation des protéines est cruciale aux cascades de signalisation intracellulaire qui régissent leurs fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, le métabolisme, la survie, l'apoptose ou encore la sécrétion de facteurs solubles. Les PKs, dont le nombre aujourd'hui représente plus de 500 protéines [1] sont des acteurs incontournables dans la compréhension de la transduction des signaux cellulaires. Un des prérequis majeurs à cette fonction est la sensibilité aux stimuli extracellulaires qui sont essentiellement transmis par leur interaction avec des récepteurs

localisés à la membrane plasmique des cellules (Figure 1). Ils représentent l'interface de communication des cellules avec leur environnement et sont généralement des protéines présentant des structures qui leur permettent la reconnaissance des stimuli. Ces récepteurs peuvent s'associer aux PKs de manière directe, ou indirecte par l'intermédiaire de seconds messagers comme les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc), les produits d'hydrolyse des phospholipides ou des variations de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ . Certaines PKs font partie intégrante de la structure des récepteurs alors que d'autres s'y associent en réponse à une stimulation, donnant naissance à une plateforme de signalisation. L'information est alors amplifiée par une cascade d'activation d'autres PKs dont l'activité est régulée, entre autres, par phosphorylation.

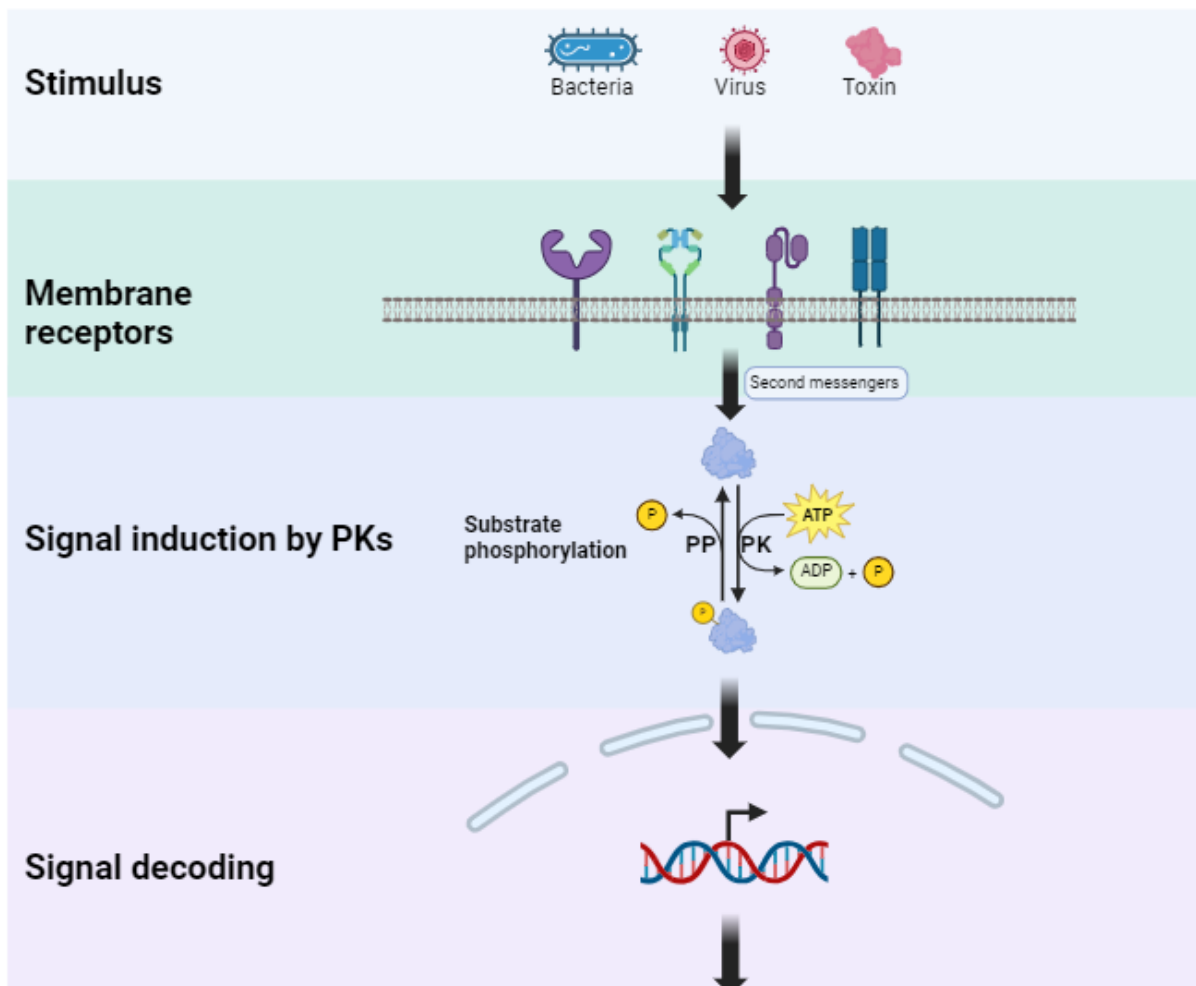


Figure 1 : *Représentation schématique simplifiée du processus de signalisation cellulaire regroupant les différents acteurs mis en jeu. PK : protéine kinase et PP : protéine phosphatase. Le signal est généré lorsque les récepteurs membranaires sont activés par des stimuli extracellulaires tels que des bactéries, des virus ou des toxines. Les protéines kinases sont alors activées soit directement par une association aux récepteurs, soit indirectement par l'intermédiaire de seconds messagers dans le cytoplasme. Il s'ensuit une cascade d'activation de substrats par phosphorylation, qui permet l'induction du signal vers le noyau et la production d'une réponse biologique.*

Les protéines cibles (substrats) sont phosphorylées par une ou plusieurs PKs sur des sites spécifiques. On distingue selon le/les sites reconnus (accepteurs), les sérine/thréonine kinases (STKs) et les tyrosine kinases (TKs). L'impact de cette phosphorylation dans la signalisation est modulé par des protéines phosphatases (PPs). Ces dernières appartiennent à une catégorie de protéines qui jouent un rôle dans la régulation des réseaux de signalisation cellulaires, rôle tout aussi important que celui des PKs, et qui retirent le phosphate des substrats.

## 1. Les sérine/thréonine kinases (STKs)

Les premières PKs sensibles aux stimuli à avoir été étudiées sont celles qui dépendent de l'AMPc [2]. Ce second messenger résulte de l'hydrolyse de l'ATP par l'adénylate-cyclase [3] et la variation de son taux intracellulaire impacte l'activité de ces protéines kinases. Les PKs AMPc-dépendantes sont composées de 2 sous-unités, dont une catalytique (C) et une régulatrice (R), qui forment un complexe conduisant à l'inactivation de la sous-unité C. L'interaction du complexe avec l'AMPc conduit à une dissociation des 2 sous-unités et se traduit par une activation de la protéine. Plusieurs formes de sous-unités des PKs appartenant à cette famille de kinases ont été décrites. Par exemple la PKA, qui fait partie des premières kinases à avoir été cristallisées [4], est une STK dont les mécanismes d'autorégulation et d'activation sont les mêmes que ceux décrits ci-dessus mais est composée de 4 sous-unités distinctes au lieu de 2 qui composent la plupart des PKs AMPc-dépendantes.

L'activité des STKs est également régulée par le niveau intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , qui est lui-même régulé par sa liaison à la calmoduline, qui est la première médiatrice de la signalisation calcique. Lorsque le niveau de  $Ca^{2+}$  est élevé, le complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline (CaM) s'associe à différentes PKs telles que la PI3K, ce qui augmente leur activité catalytique. Ces complexes forment une famille protéique composée d'au moins 6 isoformes [5] dont 3 présentent un degré de spécificité à leur substrat très élevé : la phosphorylase kinase, la myosin light chain kinase et la  $Ca^{2+}$ /calmodulin kinase III. Ces isoformes ont une structure complexe fréquemment composées de plusieurs sous unités.

La variation du niveau de  $Ca^{2+}$  est au centre de diverses fonctions cellulaires, notamment des cellules immunitaires lorsqu'elles sont stimulées par un ligand *via* leurs récepteurs, tels que le récepteur à l'antigène des cellules B (BCR), des cellules T (TCR), les récepteurs Fc ou de chimiokines. Dans les cellules B par exemple, l'activation du BCR induit une cascade d'évènements dont la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) à

partir du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), substrat de la PLC $\gamma$ 2. La liaison de IP<sub>3</sub> à son récepteur conduit à la libération de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme par le réticulum endoplasmique qui va permettre l'activation de la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine. L'activation de cette voie mène à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire [6].

L'hydrolyse des phospholipides est un événement précoce de la signalisation intracellulaire qui module l'activité de certaines STKs. Les produits issus de cette réaction agissent sur l'activité des STK en tant que seconds messagers tout comme l'AMPc et le Ca<sup>2+</sup>. Les STKs répondant à ce critère de fonctionnement sont collectivement nommées protéine kinase C (PKC) dont l'activité a été décrite comme étant dépendante du Ca<sup>2+</sup> [7] et des phospholipides. Découvertes pour la première fois par Yasutomi Nishizuka dans une fraction de cerveau de rat et de bovin, des études ont ensuite montré que leur activité était également dépendante d'un phospholipide, à savoir la phosphatidylsérine [8]. Il existe 11 isoformes de PKCs qui peuvent être catégorisées en 3 sous-groupes selon le second messenger requis (Ca<sup>2+</sup>, diacylglycérol (DAG), phospholipide) pour leur activité catalytique. Leur reconnaissance variable des seconds messagers résulte de leur structure composée de domaines conservés C1, C2, C3 et C4 séparés entre eux par des régions variables ; la différence structurelle de ces domaines définit les sous-groupes des isoformes des PKCs [9].

La famille des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) regroupe un ensemble de STKs qui sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires [10]. La signalisation mettant en jeu cette famille repose sur une cascade de phosphorylation de différentes MAPKs. Ces dernières comptent, entre autres, ERK1/2, JNK, et P38 [11] [12] qui représentent le stade terminal de la cascade de signalisation aboutissant à un signal de survie/prolifération ou de mort cellulaire. Il existe plusieurs formes de cascades de signalisation des MAPKs dans une même cellule avec des niveaux variables de sensibilité aux signaux extracellulaires. Les cascades des MAPKs mettent en jeu au moins 5 couches séquentielles d'isoformes de PKs dont 3 principales (MAP3K, MAPKK, MAPK) auxquelles sont ajoutées la MAP4K en amont et la MAPKAPK en aval. Le signal se propage par cette cascade grâce à la phosphorylation de chacune des isoformes [13]. La cascade de signalisation des MAPKs peut être initiée par divers signaux, y compris ceux impliquant des PKs associées à un récepteur [13]. Cette voie de signalisation initie des cascades qui peuvent former des réseaux, dotant ainsi la cellule d'un large système de transfert d'information.



Il existe de nombreuses autres STKs dont l'activité peut dépendre de signaux intra- ou extracellulaires passant ou non par des récepteurs membranaires. On peut citer la PKR (RNA-dependent protein kinase) qui est inductible par l'interféron (IFN) et qui est un capteur de stress intracellulaire qui s'active en réponse à une production d'ADN viral double brin [14] [15]. Une autre famille de STKs est celle des caséine kinases (CKs), nommées ainsi d'après leur capacité à phosphoryler la caséine *in vitro* [16]. Des études plus récentes montrent que cette appellation est réductrice au regard de ses autres substrats physiologiques. Malgré la place restreinte qu'elles occupent dans le kinôme humain, leur fonction est relativement large puisqu'elles sont responsables de près de 50% des sites phosphorylés connus des bases de données de phosphopeptides chez l'homme (PhosphoSitePlus®). Bien que jouant un rôle fondamental dans le devenir des cellules, les STKs sont généralement en aval d'une signalisation initiée par des tyrosines kinases permettant leur recrutement [17].

## 2. Les tyrosines kinases

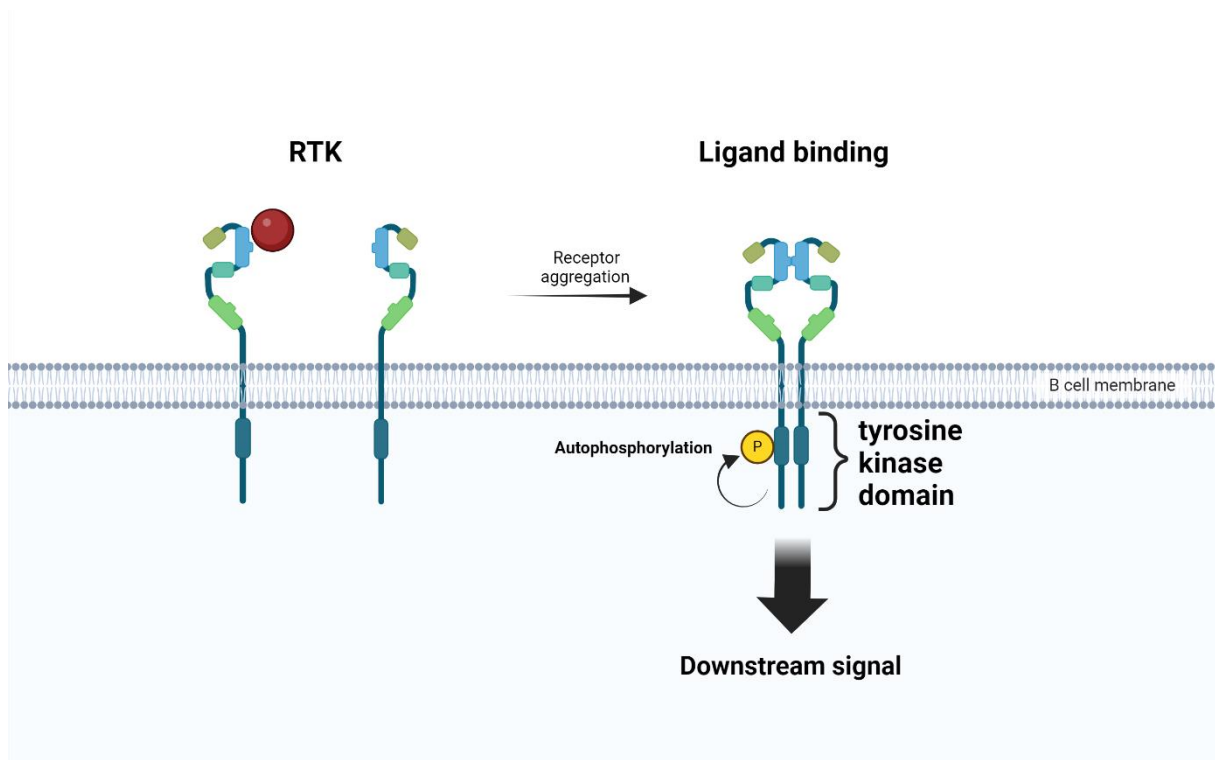


Figure 2: *Mécanisme d'activation des RTKs.* Le récepteur se dimérise suite à la reconnaissance d'un ligand. S'ensuit une activation du domaine kinase par phosphorylation qui conduit à une signalisation en aval.

Les tyrosines kinases (TKs) se distinguent en deux catégories : les Receptor Tyrosine Kinases (RTK) ou les Non-Receptor Tyrosine Kinases (NRTK). Ces PKs phosphorylent sélectivement des résidus tyrosines de différents substrats. Les premières études se sont

focalisées sur les RTKs associées aux récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGF, le PDGF, le FGF ou les récepteurs à l'insuline [18]. Ces derniers lient leurs ligands à la membrane plasmique, ce qui active les RTKs localisées dans leur partie intracellulaire composées d'environ 20 sous-groupes. Cette activation permet la transmission du signal extracellulaire qui se traduit par la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Figure 2). La stabilité conformationnelle du complexe ligand-récepteur est importante dans cette signalisation. Il peut se composer d'un ligand qui permet une agrégation du récepteur ou de deux ligands reconnus par deux récepteurs dimérisés, ce qui a pour conséquence l'activation de la kinase par autophosphorylation (en CIS ou en TRANS). L'activité kinase est contrôlée par une séquence régulatrice située aux 2 extrémités C- et N-ter de la kinase. Une fois activée, celle-ci peut transmettre le signal en aval en initiant une cascade de phosphorylation [19] [20].

Il existe au moins 8 catégories de NRTKs qui se distinguent toutes par des différences structurelles. Ces protéines cytoplasmiques contiennent un domaine kinase à activité catalytique et au moins un domaine d'interaction avec d'autres protéines ou des phospholipides, tels que des domaines SH2/3 (Src Homology) ou PH (Pleckstrin Homology) [21]. Leur domaine kinase compte environ 300 résidus formant un lobe en N-ter composé de 5 feuillets beta, d'une hélice alpha et d'un domaine cytoplasmique en C-ter hélicoïdale plus large. L'ATP se lie à la cavité formée dans le domaine kinase alors que la séquence cible du substrat interagit avec la partie C-ter du domaine kinase [19]. L'activité kinase des NRTKs est régulée positivement ou négativement par phosphorylation sur des résidus dits régulateurs tels des acides aminés sérine ou tyrosine. Cette régulation nécessite souvent des interactions avec d'autres PKs. Dans les cellules hématopoïétiques, l'activation de certaines NRTKs se fait suite à leur recrutement à la membrane en réponse à la stimulation de récepteurs immuns tels que les sous-unités  $Ig\alpha$  et  $\beta$  du complexe BCR, le CD3 et la chaîne  $\zeta$  du complexe TCR et certains récepteurs Fc. La plupart de ces immunoglobulines membranaires (IgRs) possède un motif intracellulaire d'activation appelé ITAM (Immune Tyrosine Activation Motif). Ces derniers sont des séquences conservées de 4 acides aminés qui sont répétées deux fois dans la partie cytoplasmique des IgRs. Après la liaison du ligand sur les IgRs, ces motifs ITAMs sont phosphorylés sur leurs résidus tyrosine et servent d'ancrage à des protéines pourvues de domaines SH2 permettant ainsi la propagation d'un signal activateur. A l'inverse, certains récepteurs immuns, dits inhibiteurs, présentent dans leur séquence cytoplasmique un motif ITIM (Immune Tyrosine Inhibitory Motif) qui permet le recrutement de phosphatases et ainsi inhibent l'activation cellulaire [22]. Les récepteurs à motifs ITAM peuvent également s'auto-inhiber suite à des interactions avec des ligands à faible avidité en générant un signal inhibiteur. Ce signal permet le maintien de l'homéostasie du

système immunitaire et est appelé ITAMi (ITAM-mediated inhibitory signal). Lorsqu'un récepteur à motifs ITAM est activé, son motif ITAM est phosphorylé par des TKs membranaires telles que celles appartenant à la famille des Src kinase. Cet événement est suivi du recrutement et de l'activation de NRTK, telles que Syk qui est centrale dans les voies de signalisation activées par les récepteurs à motifs ITAM. L'activation de Syk mène à l'activation de molécules de signalisation en aval telles que les PLC $\gamma$ 1/2 et/ou PI3K [23].

### III. La protéine Syk : le gène

#### 1. Apparition au cours de l'évolution

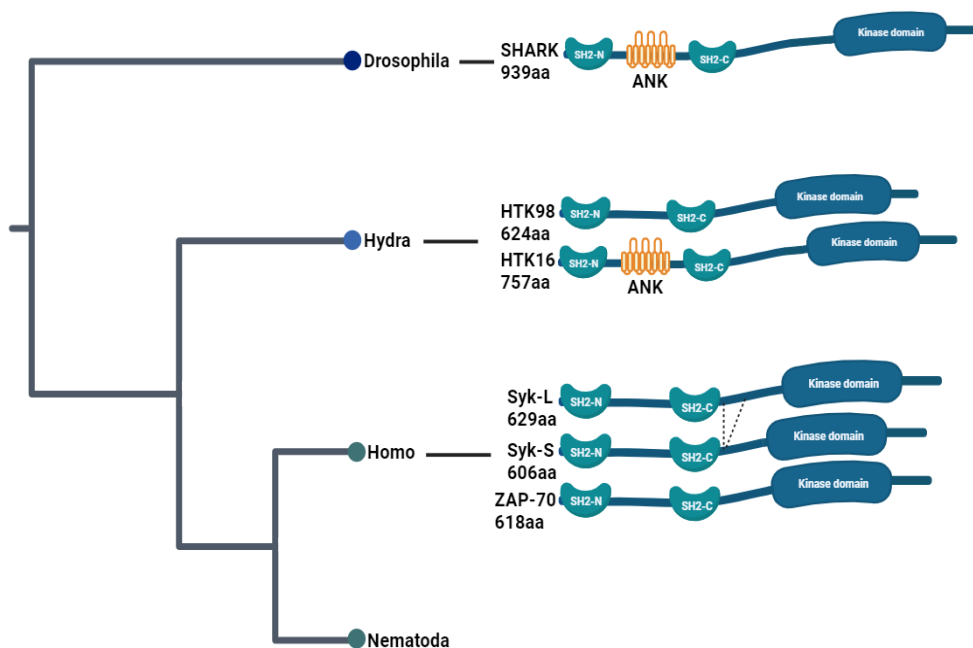


Figure 3 : *Représentation schématisée de l'expression des membres de la famille des kinases Syk et de sa conservation au cours de l'évolution. La drosophile (drosophila melanogaster) exprime une seule version de Syk (SHARK) qui contient, entre ses deux domaine SH2, une séquence ankyrin-like (ANK). L'Hydre exprime deux versions de Syk dont l'une (HTK98) est dépourvue de séquence ANK et est similaire à celle retrouvée chez les vertébrés.*

L'apparition des gènes codant pour les PTKs de la famille Syk (Syk et de Zap-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70)) est considérée comme récente dans l'évolution des espèces. En effet, l'absence de ces deux gènes dans le génome du nématode *C. Elegans* et leur expression spécifique dans certains types cellulaires, notamment dans les cellules hématopoïétiques, ont consolidé cette idée [24] [25]. Des études dans la classification phylogénétique ont conduit à la mise en évidence d'un fragment du gène codant pour la famille Syk dans une espèce d'oursin. La présence de ce fragment suggérait que la protéine générée pouvait avoir d'autres fonctions biologiques que celles connues de Syk et de Zap-70 dans l'immunité des organismes plus

évolués. L'isolation du gène HTK16 chez l'Hydre [26] et la découverte de l'ARNm codant pour Syk dans l'épithélium de ce même organisme [24] confirment un rôle de Syk chez les métazoaires au cours de l'évolution. Ce gène HTK16 qui code pour une version de la protéine Syk qui contient une séquence ankyrin-like (ANK) a également été retrouvé chez la Drosophile (SHARK). Ce dernier code pour une protéine qui est impliquée dans la morphogenèse et la formation de l'épithélium chez la drosophile. Ces observations fonctionnelles au cours de l'évolution confortent non seulement le rôle des PTKs de la famille Syk dans la communication de cellules non immunitaires, telle qu'il est décrit aujourd'hui dans les cellules des vertébrés, mais également leur spécificité dans la signalisation des récepteurs immuns chez les mammifères. En 1994, une équipe rapporte avoir isolé un gène codant pour la version humaine de la protéine Syk et montre que l'ARNm et la protéine sont tous les deux exprimés dans une grande variété de cellules de la lignée hématopoïétique [27]. Cette étude révèle également la localisation chromosomique du gène de Syk et sa haute conservation entre l'Homme et le porc. Syk est identifiée chez l'homme comme l'homologue de Zap-70, la kinase exprimée dans les cellules T.

## 2. Epissage du gène de Syk : les isoformes de Syk

L'épissage alternatif du gène de Syk, situé sur le chromosome 9q22 chez l'homme, donne lieu à l'expression de 2 isoformes : Syk-L (Long ; 635 aa) et Syk-S (Short ; 612 aa). Les 2 isoformes diffèrent entre elles par l'absence d'une région de 23 (des acides aminés en position 283 à 305) qui est également absente dans la séquence de Zap-70 (Figure 3) [28] [29]. Cette différence a un impact fonctionnel sur Syk-S puisqu'elle la rend moins efficace que Syk-L dans la signalisation liée à plusieurs récepteurs immuns [30].

Bien que la coexistence des deux isoformes ne soit pas exclue, la différence d'expression demeure une caractéristique, surtout dans des compartiments tissulaires ou cellulaires spécifiques [31]. Cette disparité est notable dans les cellules du thymus, de la rate, ainsi que dans diverses cellules hématopoïétiques, où l'expression de Syk-S est plus faible que celle de Syk-L. Une perturbation de cet équilibre se manifeste dans certains contextes pathologiques (voir chapitre 3 : Syk et physiopathologie), entraînant une augmentation de l'expression de Syk-S au détriment de Syk-L [29] [32].

La localisation subcellulaire des 2 isoformes a longtemps été considérée comme nucléaire et cytoplasmique pour Syk-L et strictement cytoplasmique pour Syk-S [29]. L'idée selon laquelle le signal de translocation nucléaire de Syk-S réside exclusivement dans la région absente de 23 acides aminés est contestée par des études démontrant que les deux isoformes de Syk possèdent une région commune (332-359) en dehors de la zone manquante, qui s'avère cruciale pour la translocation nucléaire des 2 isoformes [33]. La signification fondamentale de l'épissage alternatif dans la régulation de la protéine à travers différents types cellulaires et même entre espèces différentes mérite une attention particulière. Par conséquent, la recherche de nouvelles isoformes de Syk, telle que celle décrite chez la souris dépourvue de deux régions de 23 acides aminés correspondant à un transcrite de Syk dépourvu des exons 7 et 14, reste inexplorée [34].

### 3. Structure primaire de la protéine Syk

Les PKs de la famille Syk, à savoir Syk et Zap-70, sont des TKs cytoplasmiques. Des études ont relevé que Syk peut également phosphoryler des substrats sur des résidus sérines [35]. Ces PTKs sont connues principalement pour leur implication dans la transduction de signaux provenant de récepteurs membranaires immuns, notamment retrouvés à la surface des lymphocytes B et T. Le champ d'action de Syk a été élargi par de multiples études décrivant son expression au sein de nombreuses cellules non hématopoïétiques [31].

Comme évoqué précédemment, les PTKs cytoplasmiques partagent des structures similaires. En effet, la séquence de Syk s'organise en deux domaines SH2 en tandem, qui sont situés dans la partie N-terminale (N-t) et séparés par un court inter-domaine A de 45 acides aminés (IDA) [36]; ce dernier assure la flexibilité de la protéine lors de son interaction avec la partie intracellulaire (ITAMs) phosphorylée des récepteurs membranaires. A ces modules, s'ajoute un domaine kinase dans la partie C-terminale (C-t) de Syk séparé des deux domaines SH2 par un inter-domaine B (IDB) dans lequel est localisé la plupart des résidus dont la phosphorylation crée une plateforme de signalisation pour ses partenaires (Figures 4 et 5).

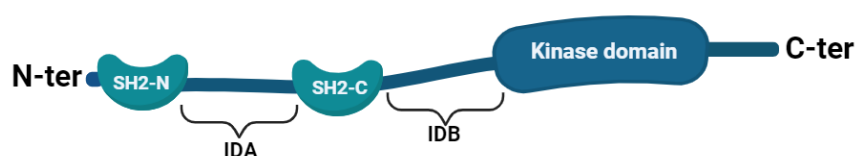


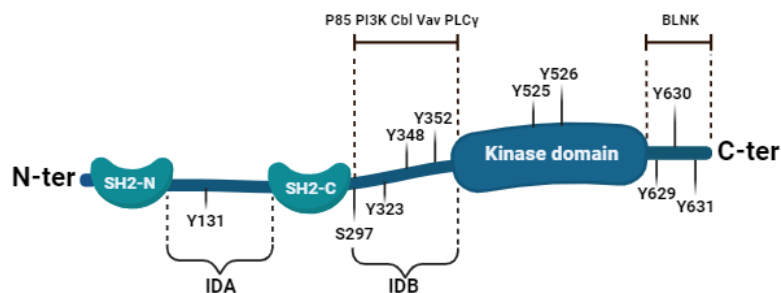
Figure 4 : *Représentation schématique de la structure linéaire de Syk montrant ses domaines SH2 et catalytique séparés par les inter-domaines A (IDA) et B (IDB).*

## 4. Modifications post-traductionnelles

### 4.1. La phosphorylation

Les modifications post-traductionnelles de Syk sont généralement étudiées pour leur contribution à son activité enzymatique tyrosine kinase, ce qui restreint la connaissance de ses fonctions dans la cellule. L'activité kinase de Syk dépend de son changement structural, qui lui-même est lié aux modifications post-traductionnelles (Figure 5) d'un certain nombre de ses résidus sérine, thréonine et tyrosine [37] [38]. La phosphorylation est l'une d'entre elles. Trente-deux sites, dont 15 résidus tyrosine, 6 résidus thréonine et 11 résidus sérine, ont été identifiés comme phosphorylés dans les lymphocytes B [39], et confèrent à Syk en plus de sa fonction kinase, une fonction adaptatrice.

A)



B)

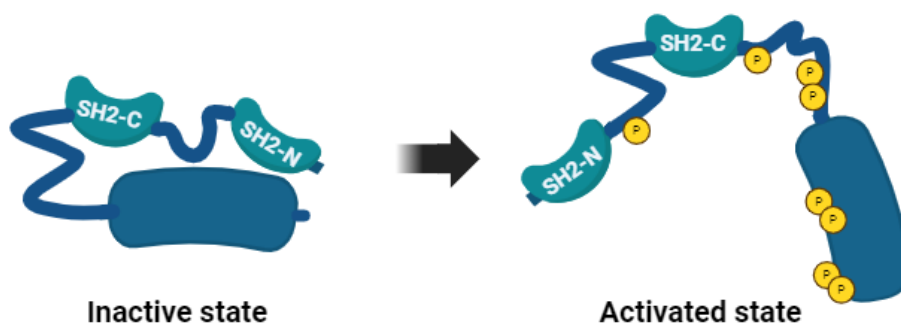


Figure 5: A) *Représentation de la séquence de Syk avec ses principaux sites de phosphorylation qui servent de sites d'ancrage à d'autres protéines effectrices des voies de signalisation (PI3K, Cbl, Vav, PLC $\gamma$ , BLNK). B) *Modèle d'activation de Syk lui permettant de passer d'une forme non phosphorylée/auto-inhibée à une forme phosphorylée /active.**

Ainsi la phosphorylation du résidu tyrosine en position 131, situé dans l'inter-domaine A, joue un rôle central dans la stabilité de l'interaction entre Syk et les motifs ITAM

phosphorylés (p-ITAM) du BCR. Cette phosphorylation contribue à l'activation de Syk (Figure 6) suite à sa dissociation des ITAMs. Ce changement d'affinité avec les p-ITAM résulterait d'un changement conformationnel de Syk [40]. Substituer ce résidu tyrosine par un résidu phénylalanine entraîne une amplification de son activité kinase et de son taux de phosphorylation par d'autres kinases en condition basale [36] [41]. Il en résulterait une protéine Syk dont la régulation de l'activité kinase échapperait au processus de signalisation déclenchée par un signal extérieur.

Dans l'IDB, les résidus phosphorylés ont souvent un double rôle, à savoir celui de servir d'ancrage à d'autres protéines et/ou de constituer des sites régulateurs de l'activité kinase de Syk.

Le résidu sérine en position 297 s'est avéré être un site majeur dans la régulation de l'activité de Syk dans la signalisation de récepteurs immuns. Phosphorylé par la PKC, ce résidu modifié sert de site d'ancrage à la protéine 14-3-3 qui séquestre Syk et réduit sa capacité à transloquer à la membrane plasmique dans les cellules B [39].

Tout comme le résidu sérine 297, le résidu tyrosine en position 323 de l'IDB, une fois phosphorylé, est décrit comme inhibiteur de Syk. Cette phosphorylation provoquée par Syk elle-même, ou par les membres de la famille Src, sert de site de liaison à l'ubiquitine ligase de la classe E3 Cbl. Cette dernière ajoute de manière covalente une ubiquitine (Ub) ou une chaîne d'Ub sur une protéine cible, ce qui conduit à la dégradation de la protéine ubiquitinylée. La reconnaissance du résidu tyrosine 323 phosphorylé par Cbl régule donc négativement Syk dans les cellules B ou les mastocytes. Substituer ce résidu tyrosine par une phénylalanine diminue son interaction avec Cbl mais également avec le domaine SH2 de la sous unité p85 de la PI3K [42].

Les autres résidus tyrosine, situés dans l'IDB en position 348 et 352, sont à la fois impliqués dans la séquence d'activation de Syk et dans sa fonction en tant que protéine adaptatrice. Suite à la liaison de Syk aux pITAMs des récepteurs immuns, la phosphorylation des résidus Y348 et Y352 par Syk et les Src, respectivement, augmente [37]. En résulte une hausse de l'activité kinase de Syk et de sa capacité à interagir avec d'autres protéines telles que Vav1 et la PLC $\gamma$ 1/2 [43] [44]. La substitution de ces deux résidus par des résidus phénylalanine réduit l'activation de la PLC $\gamma$  et la mobilisation du flux calcique. Leur substitution par des phénylalanines permet le maintien de Syk dans une conformation auto-inhibée similaire à la forme sauvage non phosphorylée [45].

Les sites les plus représentatifs de l'activité kinase de Syk sont les résidus tyrosine en position 525 et 526 qui sont situés dans le domaine kinase de la protéine. L'autophosphorylation de Syk sur ces résidus ou la phosphorylation par d'autres protéines telles que les Src modulent positivement l'activité de Syk. Ce rôle est illustré dans la lignée cellulaire DT-40 [46] par la faible activation d'effecteurs de la voie du BCR, tels que la PLC $\gamma$  lorsque ce couple de résidus tyrosine est substitué par des résidus phénylalanines. Etant donné la position de ces deux résidus tyrosines dans la boucle d'activation du domaine kinase de Syk, leur phosphorylation, plutôt que la phosphorylation globale, est consensuellement mesurée et admise comme un indicateur de son activation complète.

Dans la partie C-t de Syk, trois résidus tyrosine en position 629, 630 et 631 sont décrits pour être phosphorylés. Ce sont des sites d'autophosphorylation qui régulent négativement l'activité kinase de Syk dans les cellules T [47]. Leur mutation entraîne un gain de fonction qui se traduit par l'augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosine en position 323 et 525/526 de Syk [48]. Ceci peut s'expliquer par l'abolition d'un mécanisme de régulation de la phosphorylation de Syk qui reposerait sur la phosphorylation de ces trois résidus. Le recrutement de Syk à la membrane marque le début non seulement de modifications post-traductionnelles de Syk mais aussi de changements conformationnels. A l'issue de ces changements, la phosphorylation du résidu tyrosine 630 de Syk permet la liaison au domaine SH2 de l'adaptateur BLNK, rendant possible la signalisation dans les cellules B [40].

#### 4.2.L'ubiquitylation

L'ubiquitylation, telle qu'évoquée plus haut, est aussi une modification post-traductionnelle qui résulte d'une fixation covalente d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine sur une ou plusieurs résidus lysine accepteurs de la protéine substrat. De manière générale, cette modification biochimique conduit à la dégradation de la protéine ubiquitylée. Cet accrochage module l'activité de Syk et de manière indirecte les voies de signalisation l'impliquant [49]. Cette modification joue un rôle crucial dans les cellules B et dendritiques [50] où l'ubiquitylation de Syk par la E3 ligase Cbl, notamment Cbl et Cbl-B, affectent négativement son activité. Cela interrompt la signalisation des récepteurs DNGR-1 impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques ou la présentation de l'antigène associé à ces cellules par les cellules dendritiques. Dans ce cas de figure, l'ubiquitylation est un mécanisme de régulation négatif de Syk qui inhibe l'activité de Syk. A l'inverse, dans les plaquettes, l'ubiquitylation de Syk par Cbl ne conduit pas à sa dégradation ou à son inhibition. Après



stimulation des plaquettes, une grande proportion de Syk est rapidement ubiquitinylée et présente une activité kinase cinq fois plus forte que la forme non-ubiquitinylée [51].

## 5. Mécanismes d'activation de Syk

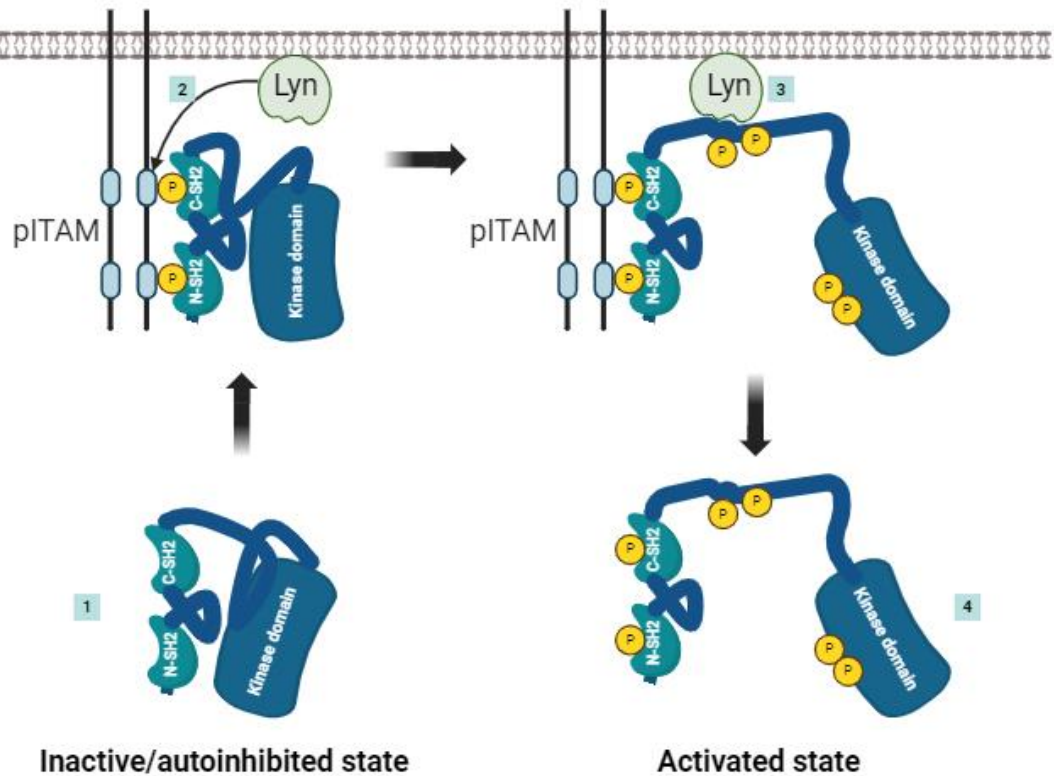


Figure 6: *Mécanisme d'activation de Syk* : 1) Syk est présent dans le cytoplasme à l'état inactif/autoinhibé. 2) Syk interagit avec les pITAMS phosphorylés par Lyn. 3) Les résidus Y352 et Y348 sont phosphorylés respectivement par Lyn puis par Syk. 4) Après phosphorylation du résidu Y131, Syk se dissocie des pITAMS et adopte un état activé. Adapté de (Mansueto, 2019).

La modélisation 3D de la forme non phosphorylée de Syk par microscopie électronique à particule révèle une structure compacte [52]. Cette conformation a été affinée par une approche plus résolutive de l'analyse cristallographique de Syk qui a été mutée sur ses résidus tyrosine 348 et 352 (Y-F), figeant ainsi Syk dans un état inactif non phosphorylé [45]. Il est à noter que l'étude cristallographique de Zap-70 avait été réalisée avant celle de Syk suite à la mutation de ses résidus Y315 et Y319 ; résidus considérés comme équivalents aux résidus Y348 et Y352 de Syk. Les résultats de cette étude montrant une structure conformationnelle auto-inhibée de Zap-70 ont permis d'avoir les premières indications structurales du mécanisme d'activation des kinases de la famille Syk [53]. L'étude du rôle structural de ces résidus dans l'activation de Zap-70 a ensuite été approfondie sur une forme sauvage de Zap-70 [54]. Ces travaux montrent que la phosphorylation des résidus tyrosine 315 et 319 jouent un rôle dans le

maintien de Zap-70 dans une conformation permettant la phosphorylation et l'activation de la boucle d'activation située dans son domaine kinase. Etant donné le haut degré de similitude entre Syk et Zap-70, le rôle similaire de ces résidus dans la régulation de Syk a été confirmé par l'analyse cristallographique de Syk où ses résidus tyrosine 348 et 352 ont été mutés [45].

La transition de cet état conformationnel fermé vers une protéine Syk ouverte implique le réarrangement structural de certains domaines par le biais de la phosphorylation (en cis ou en trans), comme le démontrent des études utilisant la microscopie électronique et des analyses biochimiques dans des cellules B [37] [55]. Dans ce modèle, en réponse à une stimulation du BCR, Syk fermée est recrutée à la membrane où elle reconnaît les motifs ITAMs phosphorylés du BCR. A la membrane, Syk s'autophosphoryle ou est phosphorylée par les Src kinases membranaires sur les couples de résidus tyrosine 348/352 et 525/526. En résulte des changements conformationnels qui la font passer d'un état conformationnel auto-inhibé à un état ouvert et activé. L'auto-inhibition résulte d'un ancrage de l'IDB sur le domaine kinase (Figure 6) qui empêche la rotation vers l'intérieur de l'hélice  $\alpha C$  se trouvant dans cet inter-domaine [56]. Cette rotation est nécessaire au changement conformationnel de la boucle d'activation du domaine kinase permettant le passage d'un état inactif à un état actif de Syk. Cet état conformationnel fermé est maintenu stabilisé par la chaîne latérale de la tyrosine 352 qui se trouve coincée entre l'hélice  $\alpha C$  et le lobe du domaine kinase. A cela s'ajoute l'orientation relative des deux domaines SH2 qui dans la forme inactive de Syk n'est pas optimale pour lier les pITAMs compte tenu de la conformation adoptée par le complexe que forment les tandems SH2 et l'IDA (tSH2). La liaison aux pITAMs est facilitée par la flexibilité de l'IDA qui amorce le changement conformationnel de Syk. Ce changement est renforcé par la phosphorylation des tyrosines 348 et 352 situées dans l'IBD nécessaire à l'activation complète de Syk comme le révèle le modèle RMN [45]. La cristallisation du complexe tSH2 de Syk lié ou non aux pITAMs révèle son rôle positif dans l'activité de Syk dans la signalisation par rapport à son homologue de la même famille Zap-70 [57]. Une étude montre, que dans sa forme auto-inhibée, le tSH2 de Syk est instable par rapport à celui de Zap-70. Cette propriété confère à Syk une capacité de sortie de sa forme auto-inhibée plus forte que Zap-70 et expliquerait la différence d'activation entre Syk et Zap-70 dans la signalisation des récepteur immuns. Les résidus situés dans la partie C-t de Syk ont aussi leur rôle dans la structure de Syk. Les études structurales de Zap-70 suggèrent que l'état conformationnel fermé des protéines de la famille Syk implique une interaction entre les résidus qui sont situés dans leur deux extrémités N-t et C-t. Concernant Zap-70, ce sont deux résidus tyrosines en C-t qui stabiliseraient la forme auto-inhibée de la kinase. Cela suggère une phosphorylation de ces résidus en réponse à une stimulation et leur

implication dans la transduction du signal [53] [58]. Concernant Syk, les triples tyrosines conservées (629, 630, 631) impliquées dans l'interaction avec BLNK sont rapidement phosphorylées en réponse à une stimulation et sont celles qui contribuent au maintien de la forme auto-inhibée de Syk. La mutation de ces résidus en phénylalanine rompt l'état auto-inhibé de Syk la rendant accessible aux autres kinases dans les cellules [58].

En ce qui concerne Syk, des études ont suggéré qu'il n'existe pas seulement sous deux états structuraux, à savoir un non-phosphorylé/inactive et un phosphorylé/actif. L'étude par spectroscopie Raman exaltée de surface menée au sein du laboratoire montre que le changement conformationnel de Syk par phosphorylation est un processus pouvant générer plusieurs formes conformationnelles en fonction de son niveau de phosphorylation [38].

## Chapitre 2 : Rôle de Syk dans la physiologie

### I. Dans le développement prénatal

Syk est une protéine multifonctionnelle qui est impliquée dès le développement comme l'ont démontré plusieurs études dans le modèle murin. Dans les souris  $Syk^{-/-}$ , l'expression de la protéine Syk a été abolie soit par la délétion d'un exon codant 41 acides aminés situés dans le sous-domaine VI du domaine kinase soit par l'insertion du gène de résistance à la néomycine dans l'exon codant le sous-domaine I de son domaine kinase [59] [60]. Les sous-domaines catalytiques I et VI sont hautement conservés dans les structures primaires des PKs [61]. Le sous-domaine I contient une séquence consensus Gly-X-Gly-X-X-Gly responsable de la liaison à l'ATP en entourant le nucléotide avec le premier résidu glycine en contact avec le fragment ribose et le second résidu glycine situé près du pyrophosphate terminal. Le sous-domaine VI, quant à lui, contient des résidus impliqués dans la reconnaissance de l'acide aminé adéquat qui sera phosphorylé. Les séquences composant ce domaine varient et sont des indicateurs de spécificité des PKs vis-à-vis de leur cible composée de résidus serine/thréonine ou tyrosine. Les modifications apportées sur ces domaines par délétion ou insertion sur le gène de Syk provoquent l'expression d'une protéine instable ou non fonctionnelle chez ces deux modèles murins. L'absence de Syk a un impact majeur sur le développement prénatal des souris. En effet, les souris  $Syk^{-/-}$  présentent de sévères hémorragies dans de nombreux organes et des œdèmes au jour 14 du stade embryonnaire qui conduisent à la mort des souriceaux dans la période périnatale, voire dans les jours qui suivent leur naissance. L'absence de Syk chez ces souris conduit également à des anomalies dans la communication des systèmes sanguin et lymphatique qui ne se séparent pas lors du développement vasculaire lymphatique. Cette anomalie conduit à une infiltration de sang dans les vaisseaux lymphatiques chez les embryons  $Syk^{-/-}$ , expliquant les hémorragies sévères observées. Cela s'explique par la formation de vaisseaux chimériques composés de cellules endothéliales lymphatiques et sanguines [62]. Ces phénotypes montrent l'importance de Syk dans le maintien de l'intégrité vasculaire et sa participation à la mise en place du système immunitaire.

## II. Dans l'homéostasie tissulaire

Syk est connue pour son rôle prépondérant dans la signalisation des cellules hématopoïétiques, en particulier dans la signalisation des récepteurs immuns. Ce rôle lui permet d'être au centre des réponses immunitaires, telles que la prolifération et la différenciation. Aujourd'hui, son rôle s'étend à d'autres types cellulaires.

### 1. Syk dans les cellules hématopoïétiques

#### 1.1. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des acteurs cruciaux du système immunitaire et leur fonction dans la réponse immunitaire adaptative dépend d'un BCR fonctionnel capable de reconnaître l'antigène. L'expression de ce BCR correspond à la maturité des cellules B dont le développement est marqué par l'expression de nombreux facteurs transcriptionnels et récepteurs membranaires. Les cellules B se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH). Ces dernières se différencient en progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (CLP) à partir desquels se forment les lignées myéloïdes et lymphoïdes d'où les lymphocytes B sont originaires [63]. Les étapes de différenciation médullaire sont indépendantes de l'antigène alors que la différenciation et la maturation qui se poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires dépend de la présentation antigénique.

##### 1.1.1. Hématopoïèse

Dans la moelle osseuse, les CLP expriment déjà des marqueurs du développement des cellules B (CD34, CD38, CD117, CD179B) [64]. Elles donneront naissance aux progéniteurs B (pro-B) dont la maturation, indépendante de l'antigène, est marquée par des réarrangements séquentiels des gènes constituant le BCR.

B cell development in the bone marrow

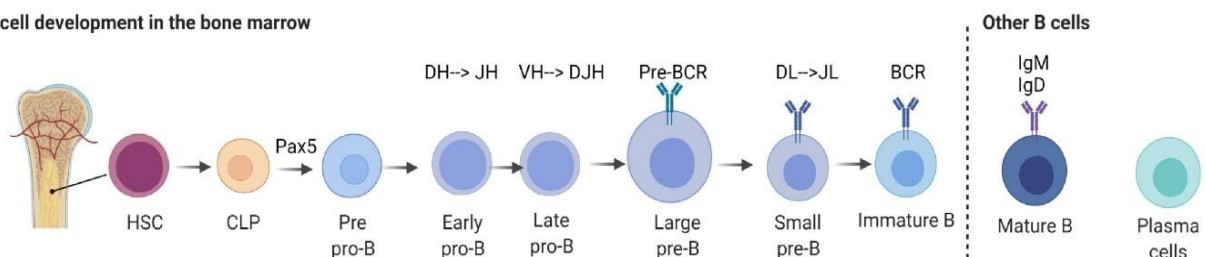


Figure 7 : *Représentation schématique du développement des cellules B (Tergaonkar, 2022). Différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers des cellules pro-B aux cellules B immatures en passant par les cellules pré-B. Les étapes de réarrangement des gènes codant le BCR et de sa maturation sont représentés.*

Les cellules pro-B sont caractérisées par l'expression de la tyrosine phosphatase transmembranaire CD45R, du récepteur à l'interleukine-7 (IL-7) et du CD19 qui sera le marqueur des cellules B à tous les stades de leur développement jusqu'à leur maturité. La signalisation de l'IL-7 contrôle à ce stade la croissance des pro-B en induisant l'expression de gènes spécifiques du développement des cellules B, en induisant leur prolifération ainsi que leur survie. L'IL-7 engage également l'accès aux gènes codant pour les molécules d'assemblage du BCR, RAG1/2, qui initie la recombinaison du locus des gènes codant les chaînes lourdes du BCR [65] [66]. Il en résulte une diversité des récepteurs assurée par deux processus dont le premier est la diversité combinatoire des gènes V<sub>H</sub> (Variable), D<sub>H</sub> (Diversité) et J<sub>H</sub> (Jonctionnel) codant les régions variables des chaînes lourdes (V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>) et des chaînes légères (V<sub>L</sub>J<sub>L</sub>). Le second mécanisme est la diversité jonctionnelle qui résulte d'une jonction imprécise de ces gènes.

#### 1.1.1.1. Développement indépendant de l'antigène dans la moelle osseuse

La maturation des lymphocytes B dans la niche médullaire commence par le réarrangement séquentiel des gènes codant le BCR. On peut distinguer 3 stades de développement selon le réarrangement des gènes des chaînes lourdes ou légères. Au cours du premier stade correspondant aux cellules pro-B précoces, s'opère un réarrangement des gènes D et J de la chaîne lourde sur les deux allèles du locus de l'immunoglobuline (Ig); le second

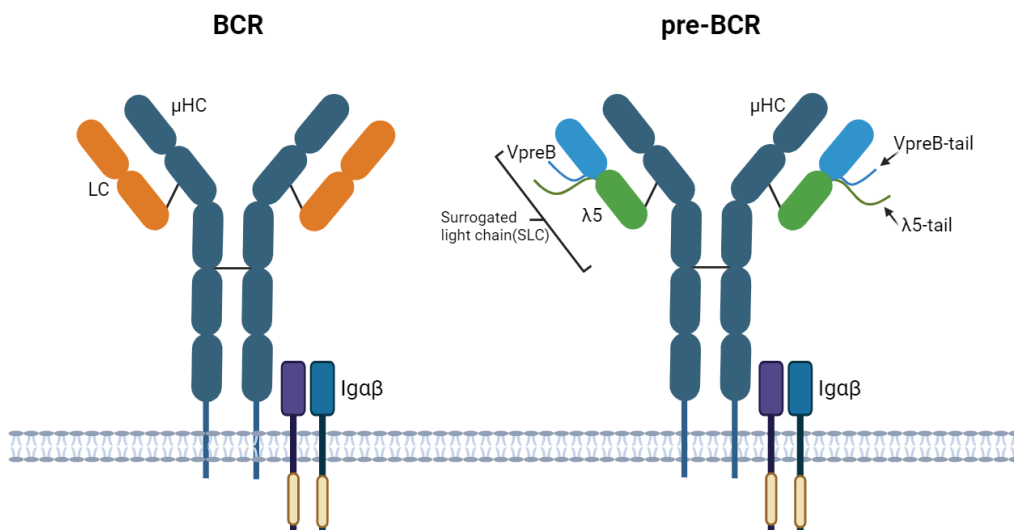


Figure 8 : *Structure schématique du BCR et du pré-BCR* : Le BCR est constitué de deux chaînes légères (LC) et de deux chaînes lourdes (HC) associées aux sous-unités Ig- $\alpha\beta$ . Le pré-BCR contient une pseudo-chaîne légère (Surrogate Light Chain) composée des chaînes  $\lambda 5$  and VpreB contenant chacune une région unique représentée par des queues sortantes des chaînes respectives.

suit immédiatement et correspond à celui des pro-B tardives avec la jonction du gène V aux segments DJ sur un allèle.

La recombinaison permet la synthèse d'une chaîne lourde  $\mu$ HC après exclusion allélique de l'un des deux allèles de l'Ig, ce qui donne naissance au pré-BCR (Figure 8) [67]. La signalisation autonome de ce dernier bloque la recombinaison du second allèle en régulant négativement l'expression des protéines RAG. L'expression du pré-BCR, composé désormais de deux chaînes lourdes  $\mu$  associées à une pseudo-chaîne légère (Surrogate Light Chain (SLC) constituée de 2 protéines invariantes VpreB et  $\lambda 5$ ) (Figure 8), ainsi que des deux sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ , marque le stade pré-BII qui constitue le premier point de control du développement des cellules B [68].

Le pré-BCR reconnaît des antigènes du soi qui leur sont présentés par les cellules stromales dans la moelle osseuse. Le signal généré par le pré-BCR est décisif pour la suite du développement des cellules B puisqu'il élimine leur dépendance à l'IL-7 et induit leur prolifération avec une contribution cruciale de Syk et des Src kinases dans cette phase d'expansion [69]. Tout au long de leur développement les cellules B présentent une expression faible de Zap-70 qui varie selon le stade de développement dans lequel elles se trouvent. L'étude de cette expression dans les cellules B montre que, quel que soit leur stade de développement, celles-ci expriment environ 2 à 4% du niveau de Zap-70 retrouvé dans des thymocytes. Cette expression atteint son plus haut niveau au stade pro-B où elles expriment environ 6% du niveau retrouvé dans les thymocytes [70]. Zap-70 est capable de compenser une déplétion de Syk dans la signalisation du pré-BCR chez la souris mais en condition normal seule Syk est impliquée dans le développement des cellules B. Par ailleurs, si la déplétion de ZAP-70 seul n'a aucun impact négatif sur ce développement, celle des deux produit l'effet inverse. Dans les souris Syk<sup>-/-</sup> et ZAP-70<sup>-/-</sup>, un arrêt complet du développement de la lignée B est observé dans la moelle osseuse au stade pro-B avec une interruption de leur expansion clonale [70] [71].

Le signal généré par le pré-BCR permet de contrôler la fonctionnalité de la chaîne lourde et assure la sélection positive des précurseurs des cellules B immatures [72]. Cette signalisation induit l'arrêt de l'expression de la SLC et une disparition du pré-BCR en activant une boucle de rétrocontrôle négatif qui a pour effet la répression des gènes codant pour les chaînes  $\lambda 5$  et VpreB [73]. Chez l'homme, les cellules pré-BII subissent une à deux divisions au cours

desquelles sont réarrangés les gènes codant les chaînes légères kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ) qui remplacent les SLC.

Leur combinaison avec la chaîne lourde  $\mu$  permet la formation d'un BCR constitué d'une IgM ou IgD (Figure 8) exprimée à la surface des cellules B immatures [74]. Ce processus de recombinaison implique les quatre allèles des chaînes légères de l'Ig dont deux de la chaîne  $\kappa$  qui seront les premières à être recombinées suivi des deux de la chaîne  $\lambda$ . Le réarrangement se poursuit jusqu'à l'obtention d'un BCR fonctionnel dont la signalisation interrompt le réarrangement. La prévention de l'apparition de cellules B auto-réactives repose sur trois mécanismes : la poursuite des tentatives de réarrangements des chaînes légères par les cellules concernées (correction du récepteur), leur insensibilisation à la stimulation antigénique (anergie) et enfin la mort cellulaire par apoptose (délétion clonale). A l'issue de la sélection négative, les lymphocytes B expriment un BCR fonctionnel non auto-réactif avec une spécificité antigénique unique [75]. Les cellules B immatures migrent ainsi vers la rate où sera finalisé leur développement en se différenciant en cellules B naïves.

#### 1.1.1.2. Maturation dépendante de l'antigène : dans les organes lymphoïdes secondaires

Dans la rate, les cellules B immatures et naïves continuent leur maturation en passant par plusieurs stades de différenciation orchestrés d'une part par le signal tonic généré par le BCR nouvellement exprimé, formé d'une IgM, d'une IgD et d'autre part d'un membre de la famille des récepteurs au TNF qui est BAFF. Cette maturation dépendra aussi de l'interaction des cellules B avec des éléments médullaires et stromales de la rate avec lesquels elles entreront en contact. Ces différents stades de développements sont caractérisés par l'expression couplées de marqueurs de surface des cellules B immatures (CD24, CD93), d'isotype du BCR (IgD) et de corécepteurs, tels que le CD21 (récepteur 2 du complément) ou le CD23 [76]. Ainsi les cellules dont le signal du BCR est fort se différencient en cellules B de la zone marginale avec une forte expression de l'IgM et du CD21, et une faible expression de l'IgD et pas d'expression du CD23. Celles dont le BCR présente un faible signal évoluent en cellules B folliculaires (majoritaire à 80%) avec une forte expression d'IgD à la surface, faible de l'IgM, intermédiaire du CD21 et forte du CD23. Les cellules B de la zone marginale ont comme précurseurs des cellules B immatures au stade translationnel 2 (T2) selon la classification actuelle et présentent une forte expression du CD21. Elles sont issues de la population de cellules B immatures au stade T1 nouvellement entrantes dans la rate. Elles sont sélectionnées positivement pour devenir



des cellules B de la zone marginale et démontrent une grande diversité fonctionnelle de leur récepteur. Une fois sélectionnées, elles occupent la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires (5 à 7%). Le trafic de ces cellules est régulé par leurs interactions avec des intégrines, la sphingosine-1-phosphate et le CXCR7 [77] [76].

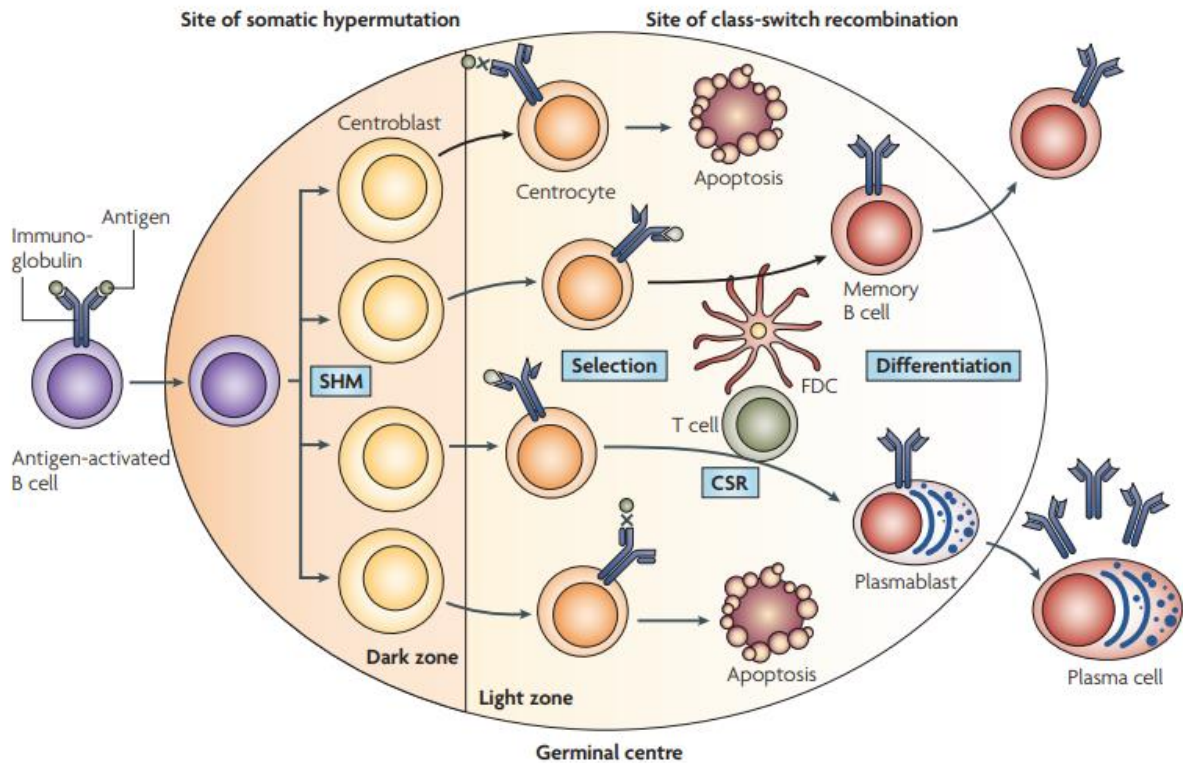


Figure 9 : **Structure du microenvironnement d'un centre germinatif** : Les cellules B du centre germinatif subissent des hypermutations somatiques dans la zone sombre (DZ) et rejoignent la zone claire (LZ) où le récepteur avec une meilleure affinité est sélectionné grâce aux lymphocytes T-helper et aux cellules folliculaires dendritiques (FDCs). Le centrocyte sélectionné se différencie en cellule B mémoire ou en plasmocyte sécréteur d'anticorps [78].

Les cellules B folliculaires, quant à elles, dont les précurseurs sont des cellules B immatures au stade T2 exprimant de façon intermédiaire le CD21, circulent entre les follicules de la rate, le sang, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer. Dans ces organes, elles entrent en contact avec l'antigène qui leur est spécifique et de manière T-dépendante, se différencient soit en plasmocytes éphémères sécréteurs d'anticorps de type IgM, soit entament la formation de centres germinatifs (GC) (Figure 9). Ces GC sont des structures compartimentées en zones sombres (DZ) et claires (LZ) où s'opère la maturation secondaire d'affinité des lymphocytes B, comportant plusieurs mécanismes moléculaires dont la commutation de classe et les hyper-mutations somatiques. Dans la DZ, les cellules se divisent et accumulent des mutations dans les gènes codant les régions variables des Ig et progressent vers la LZ où elles subissent une sélection d'affinité. Initialement productrices d'anticorps

spécifiques d'un antigène, mais de faible affinité, les cellules B se transforment dans les GC suite à plusieurs cycles d'hyper-mutation somatique et de sélection, en clones exprimant des anticorps spécifiques de plus forte affinité. La recombinaison isotypique T-dépendante s'opérant dans les DZ, génère des anticorps de différents isotypes (IgG, IgE ou IgA) avec des fonctions différentes. Cette recombinaison est induite par l'interaction entre le CD40 exprimé par les lymphocytes B et le CD40L des lymphocytes T. A l'issue de ces réactions sont produits des plasmocytes sécrétant des anticorps de forte affinité et des lymphocytes B mémoires [79] [80].

### 1.1.2. Le BCR : Structure

Le BCR est un complexe tétramérique constitué de deux chaînes peptidiques d'immunoglobuline (Ig HC) de 55 kDa, appelées chaînes lourdes, qui sont reliées entre elles

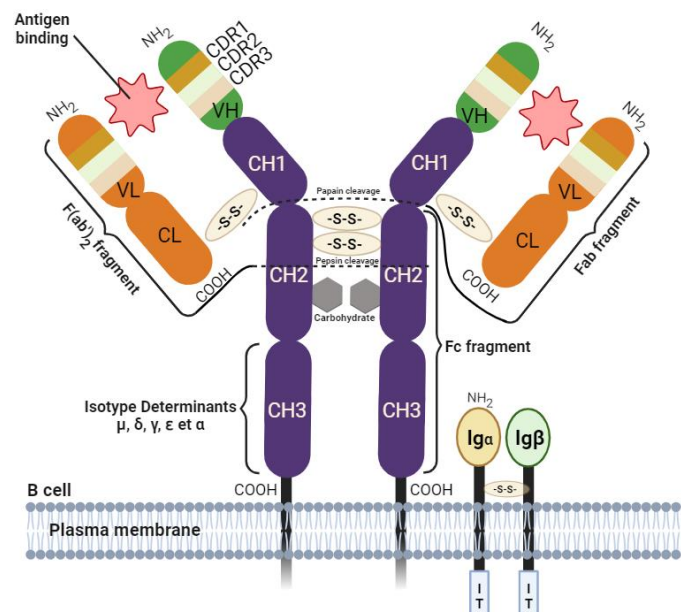


Figure 10: Structure du BCR associé à ses sous unités  $Ig\alpha/\beta$  (CD79A/B). La région constante (Fc) détermine l'isotype du BCR. (Adapté de [259]).

par des ponts disulfures. Chaque chaîne lourde est associée par un pont disulfure à une chaîne légère d'environ 25 kDa. Les chaînes lourdes et légères sont composées d'un domaine constant (C) en C-ter et d'un domaine variable (V) en N-ter (VH pour la chaîne lourde et VL pour la chaîne légère) (figure 10) qui permettent de reconnaître plus de  $5.10^{13}$  antigènes différents [74]. Chez l'homme et la souris, 5 classes d'isotypes d'Ig (IgM, IgD, IgG, IgE et IgA) existent selon le gène codant la région constante ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$ ) [81].

La chaîne lourde est complétée par un fragment intracellulaire composée de trois acides aminés lysine, valine, lysine. Le BCR ne contient pas de motifs de signalisation et nécessite donc les hétérodimères  $Ig\alpha$  également appelé CD79A et  $Ig\beta$  aussi appelé CD79B pour activer le signal [82] [83]. Ces derniers contiennent une séquence conservée ITAM où chaque résidu tyrosine est séparé d'un résidu leucine ou isoleucine par deux acides aminés dans l'empreinte YxxL/I. Cette dernière est répétée généralement deux fois avec une séparation par 7 à 12 acides aminés dans le domaine intracellulaire des ITAMs leur donnant la signature YxxL/I<sub>7-12</sub>YxxL/I. La stimulation du BCR conduit à la phosphorylation de ces résidus tyrosine qui signe le recrutement et l'activation des PTKs telles que Lyn, Syk, Blk dont l'interaction conduit à l'activation de multiples voies de signalisation. Parmi ces voies, celles impliquant la phospholipase C gamma 2 (PLC $\gamma$ 2) ou la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) sont retrouvées [84].

### 1.1.3. Le BCR : Signalisation

La reconnaissance d'un antigène spécifique par le BCR déclenche des signaux intracellulaires (Figure 11).

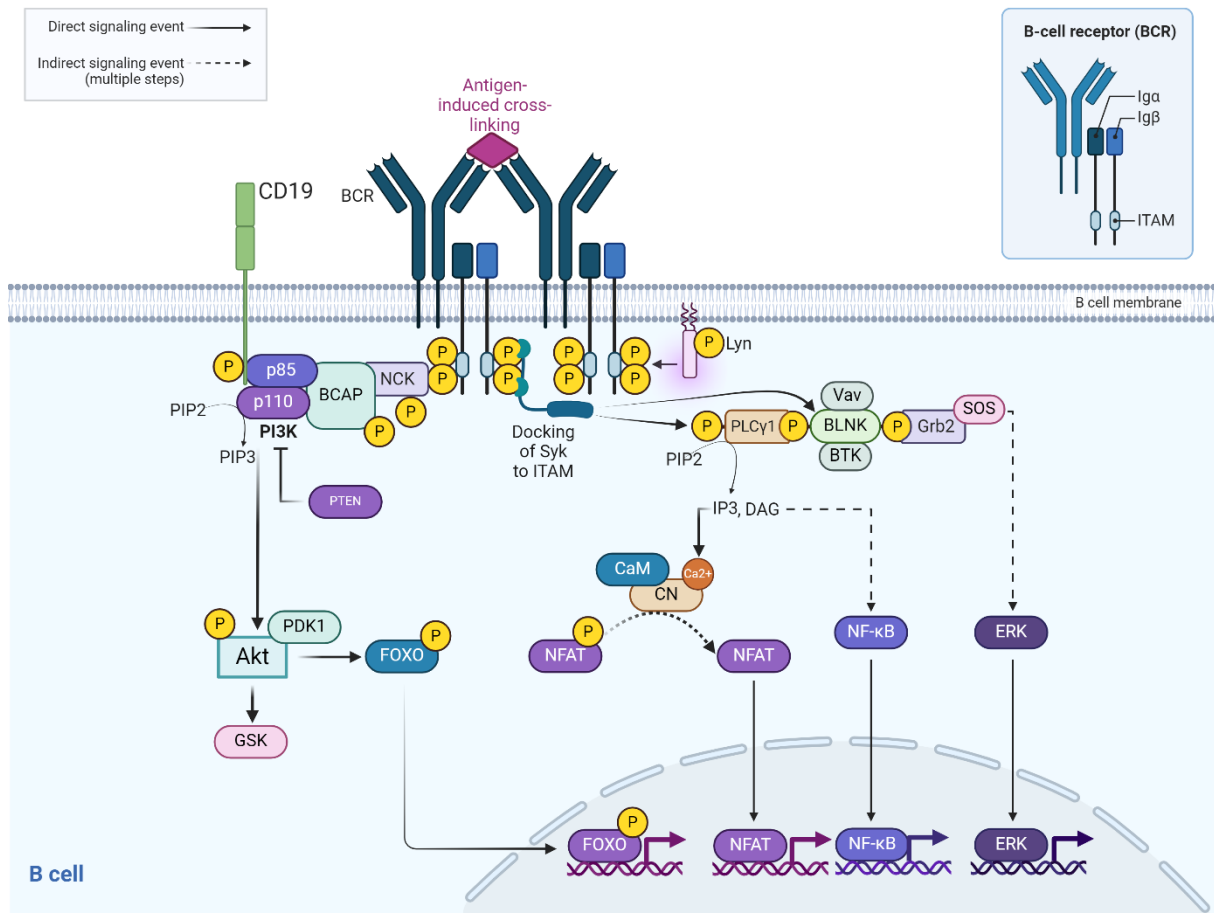


Figure 11: *La voie de signalisation du BCR : En réponse à une stimulation antigénique, la cascade de signalisation débute avec la phosphorylation des ITAMs des sous unités Igα/β (CD79A/B) par la Src kinase activée, Lyn. S'ensuit le recrutement et l'activation des kinases proximales du BCR telle que Syk qui initie la mise en place d'un signalosome constitué d'effecteurs tels que BTK, PLCγ2 et BLNK. La liaison de l'antigène au BCR est accompagnée du recrutement et de l'activation en parallèle d'effecteurs autour du CD19 qui conduit à la mise en place de l'axe de signalisation PI3K-AKT. Adapté d'après [84].*

Les cellules B reconnaissent les antigènes par l'intermédiaire du BCR [85]. L'organisation de la membrane plasmique des cellules B impacte la signalisation du BCR. En absence d'antigène, le BCR constitue un complexe oligomérique préassemblé qui génère un signal autonome faible qui est nécessaire au bon fonctionnement et au développement des cellules B. La reconnaissance d'un antigène spécifique provoque une réorganisation de ce complexe dans des domaines lipidiques spécialisées, appelés radeaux lipidiques. Cette réorganisation comprend non seulement le BCR mais aussi ses corécepteurs, tel que le CD19 dont la proximité avec le BCR module l'intensité de la propagation du signal dans la cellule. Les SFKs, notamment Lyn, grâce à leurs modifications post-traductionnelles sont enrichies dans les radeaux lipidiques qui représentent des structures membranaires cruciales pour la propagation du signal généré par le BCR [86] [87].

### 1.1.3.1. Signalisation en aval du BCR

La stimulation du BCR fait intervenir plusieurs effecteurs localisés dans les radeaux lipidiques. Leur proximité avec le récepteur initie des événements précoces de la transduction du signal. Parmi ces effecteurs, les Src kinases dont Lyn, Fyn et Blk sont associées aux radeaux lipidiques et phosphorylent les motifs ITAMs des sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  pour permettre le recrutement de Syk [84] [88]. A ce stade de la signalisation, la composition des effecteurs dans ces domaines membranaires riches en radeaux lipidiques a un effet modulateur sur le signal généré et dépend du type d'antigène reconnu [89]. L'engagement du BCR par des antigènes multimériques induit un regroupement spatial de plusieurs BCR à la membrane plasmique dans laquelle la phosphorylation de ses ITAMs passe essentiellement par Syk qui compense une absence des SFKs. En revanche, une stimulation du BCR par un ligand monomérique entraîne une organisation membranaire du complexe formé autour du BCR qui nécessite le recrutement de Syk et des SFKs pour une activation rapide et complète du BCR. Ainsi l'initiation de la signalisation du BCR dépend de la nature stérique de l'antigène (monomérique ou multimérique) qui influence la composition des protéines effectrices [88].

Parmi les SFKs impliquées, Lyn est la première kinase qui initie la phosphorylation des ITAMs. Suite à l'activation du BCR, Lyn sort de son état auto-inhibé et complète son activation par auto-/trans-phosphorylation. Compte tenu de sa proximité avec le BCR, Lyn phosphoryle la première tyrosine du motif ITAM des sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  [90]. Cette phosphorylation permet le recrutement de Syk par l'intermédiaire de son domaine SH2 ce qui permet son activation suite à son changement conformationnel. L'activation de Syk permet la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif dans laquelle d'autres SFKs contribuent avec Syk à la phosphorylation effective des ITAMs. Dans un système où l'activité des SFKs est déplétée, Syk compense entièrement cette phosphorylation en complétant cette boucle. Le pool de Syk impliqué dans ce mécanisme présente une activité basale moins performante pour phosphoryler les ITAMs comparée à celui des SFKs. En absence de stimulation du BCR, cette boucle est rompue et les ITAMs sont rapidement déphosphorylés pour aboutir à une faible quantité de Syk dont l'activité basale permet la génération d'un signal faible (tonique) du BCR par phosphorylation peu soutenue des ITAMs [91] [88].

La phosphorylation des ITAMs permet la mise en place d'un « signalosome » autour de Syk. Ce complexe protéique est constitué de plusieurs effecteurs dont la protéine d'échafaudage BLNK qui est activée par phosphorylation sur plusieurs résidus tyrosine. Ces derniers servent

de site d'ancrage aux domaines SH2 d'autres effecteurs dont BTK (Bruton's tyrosine kinase), la PLC $\gamma$ 2 (phospholipase  $\gamma$ 2), l'échangeur de nucléotides Vav et GRB2 [84].

### 1.1.3.2. La voie PLC $\gamma$ 2-Calcium-NFAT

Dans le signalosome, les protéines Syk, BTK et PLC $\gamma$ 2 se rapprochent grâce à la reconnaissance des résidus tyrosine phosphorylés de BLNK. Cette proximité permet la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 sur ses résidus tyrosine 753, 759 et/ou 1217 par les kinases Syk et BTK. Ces phosphorylations activatrices permettent à PLC $\gamma$ 2 de synthétiser des seconds messagers, à savoir le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$ ) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP $_2$ ) ; ceci permet la transmission du signal en aval (figure 11). En général, le réticulum endoplasmique (RE) regorge de Ca $^{2+}$  qui est retenu par la protéine transmembranaire STIM1. La liaison de l'IP $_3$  à son récepteur (IP $_3$ R) à la membrane du RE induit le relargage rapide et temporaire du Ca $^{2+}$  dans le cytoplasme. La déplétion de Syk provoque une diminution de la réponse calcique en réponse à une stimulation du BCR. L'augmentation transitoire de la concentration calcique issue du RE déclenche l'ouverture des canaux calciques ORAI, qui sont situés à la membrane plasmique et laissent entrer le Ca $^{2+}$  extracellulaire. Ce processus nommé SOCE « Store-Operated Ca $^{2+}$  Entry » permet une prolongation de la montée du Ca $^{2+}$  dans le cytoplasme et est régulé par deux familles majeures de protéines à savoir STIM et Orai. Ces dernières sont activées par les protéines STIM lorsqu'elles détectent une baisse de concentration du Ca $^{2+}$  [92] [84]. L'entrée du Ca $^{2+}$  active des protéines telles que la calmodulin kinase (CaMK) et la serine/thréonine phosphatase calcineurine. Le complexe formé par ces deux dernières déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of T cells), provoquant sa translocation dans le noyau et la production d'interleukine-10 (IL-10) [93].

### 1.1.3.3. La voie PI3K-AKT

L'activation de la voie PI3K implique aussi le CD19. Ce dernier est une glycoprotéine de surface de 95 kDa qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et qui est exprimée à un stade précoce du développement des cellules B et qui persiste jusqu'à leur phase terminale de différenciation plasmocytaire (voir Chapitre 2/1.1.1. Hématopoïèse chez l'adulte). Le CD19 est constitué d'une queue cytoplasmique contenant neuf résidus tyrosine conservés qui est conservée chez l'homme et la souris. En réponse à une stimulation du BCR, ces résidus tyrosine sont phosphorylés par Syk et les Src-kinases Lyn et Fyn. L'association de Lyn au CD19



phosphorylé permet de la maintenir dans un état conformationnel actif. Ces résidus tyrosine phosphorylés résultent d'une colocalisation entre le BCR IgM et le CD19 qui sert de site d'ancrage au domaine SH2 de la sous-unité régulatrice P85 de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [94] [84] [95]. L'un des acteurs requis à l'activation de la voie PI3K sont les protéines adaptatrices NCK1 et 2 qui se fixent directement au résidu tyrosine 204 phosphorylé de l'Ig $\alpha$ . Elles permettent ainsi le recrutement et la phosphorylation de la protéine BCAP par Lyn dans le complexe formé autour du CD19. Ce complexe déclenche la transduction du signal qui débute par la phosphorylation de PIP2 par la PI3K générant ainsi du PIP3. Celui-ci permet le recrutement de la protéine kinase 1 dépendante du 3-phosphoinositide (PDK1) et d'AKT à la membrane plasmique. Au cours de ce recrutement, AKT est activée par phosphorylation sur ses résidus thréonine en position 308 et sérine en position 473 par PDK1 et mTORC2 respectivement [96].

Une fois activée, AKT joue de multiples rôles dans la fonction des cellules B, notamment dans la régulation de leur survie par l'inhibition de la signalisation mTOR en phosphorylant le complexe *tuberous sclerosis protein complex* (TSC) qui l'active. La phosphorylation inhibitrice de la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) par AKT permet également l'activation des voies qui régulent la croissance cellulaire impliquant c-MYC et la cycline D3. Les cibles clés d'AKT dans les cellules B sont les facteurs de transcription Forkhead box O (FoxO) dont la phosphorylation induit leur translocation du noyau vers le cytoplasme où ils sont dégradés par le protéasome. Il en résulte une inhibition de la transcription des molécules pro-apoptiques augmentant ainsi leur survie [97] [84].

En dehors du CD19, la signalisation du BCR est modulée par d'autres co-récepteurs tels que les CD5, CD22 et CD72 qui la régulent négativement grâce à leur motifs ITIM. Ces derniers sont phosphorylés par les Src-kinases, notamment Lyn, qui jouent donc un double rôle sur la signalisation du BCR soit en tant qu'activateur soit en tant qu'inhibiteur. Une fois phosphorylés, les ITIMs permettent le recrutement des phosphatases 1 et 2 (SHP1 et SHP2) et SHIP (lipid phosphatase SH2-domain containing inositol phosphatase) grâce à leur domaine SH2 [84]. Ces phosphatases déphosphorylent les effecteurs de la propagation du signal tels que les sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ , Syk et PLC $\gamma$ . Quant aux Src-kinases, elles sont soumises à une dégradation suite à leur ubiquitination par Cbl, conduisant à leur régulation négative. Ce mécanisme de régulation concerne également Syk dans la signalisation du BCR dont l'intensité augmente dans les cellules B de souris déplétée en protéine Cbl [84].

## 1.2. Les lymphocytes T

### 1.2.1. Syk dans le développement des cellules T

Les lymphocytes T ont leurs progéniteurs dans la moelle osseuse et poursuivent leur développement et leur maturation dans le thymus. Cet organe est un lieu de maturation des thymocytes dont le processus de signalisation implique en partie Syk. Contrairement aux cellules B, dont le développement repose sur les signalisations du pré-BCR et du BCR qui dépendent de Syk, celui des cellules T est rythmé par des transductions du signal qui engageant d'abord le pré-TCR qui est soutenu par Syk et ZAP-70 et puis le TCR qui est supporté par ZAP-70. L'expression différentielle de ces deux kinases de la même famille au cours du développement des cellules T traduit leur rôle distinct [98] [99].

Dans le thymus, le pré-TCR initie, après réarrangement des gènes codant pour les chaînes du TCR, son expression ainsi que celle de ses corécepteurs, le CD4 et le CD8. Les progéniteurs T nouvellement immigrés dans le thymus au stade de doubles négatifs pour les CD4 et CD8 (DN) se différencient en progéniteurs doubles positifs CD4 et CD8 (PD) [100]. La population des thymocytes double négatifs est subdivisée en quatre catégories, de DN1 à DN4, selon l'expression des marqueurs de surface CD44 et CD25. L'expression du pré-TCR formé d'une chaîne TCR $\beta$  réarrangée associée à une chaîne invariante pT $\alpha$ , engage ces progéniteurs T dans la lignée  $\alpha\beta$ , l'expansion et la différenciation des progéniteurs du stade DN vers le stade DP. Syk et ZAP-70 jouent des rôles distincts au cours de cette phase de sélection. En effet, seule Syk est exclusivement requis dans la signalisation du pré-TCR des thymocytes jusqu'au stade DN3. Ce stade est composé de thymocytes DN3-E quiescents, avec un TCR $\beta$  en cours de réarrangement, et DP entrés en cycle cellulaire.

Chez les souris Syk<sup>-/-</sup>, les thymocytes présentent un défaut de transition des stades DN-3 au DN-4 lors de la phase d'expansion cellulaire dans le thymus. L'absence complète de signal due à la déplétion de Syk donne naissance à des cellules de petites tailles et quiescentes qui sont incapables d'entrer dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, dans des modèles murins doublement négatives pour Syk et ZAP-70, les thymocytes ne dépassent pas l'étape d'expression du pré-TCR. Jusqu'à ce qu'ils entament leur entrée au stade DN2, les progéniteurs des cellules T expriment fortement Syk et faiblement ZAP-70. Après réarrangement du TCR $\beta$ , Syk permet d'une part la sortie des thymocytes en DN3-E en quiescence par une signalisation optimale de leur pré-TCR et, d'autre part leur entrer dans le cycle cellulaire. Ceci signe leur transition au



stade DN3-L pour progresser au stade DP. Au cours de ce processus Syk régule positivement l'expression de ZAP-70 dont la fonction devient optimale au stade DN4 jusqu'en DP où il remplace complètement Syk dans la signalisation du TCR [99]. Les souris ZAP-70<sup>-/-</sup> ont un développement normal des thymocytes qui va au-delà de l'expression du pré-TCR avant de s'interrompre à l'étape d'expression d'un TCR mature et du stade DP. A ce stade, ZAP-70 favorise la phase de prolifération et la différenciation des thymocytes, malgré une co-expression de Syk, après laquelle les cellules sont soumises à l'étape cruciale de sélection positive et négative. Cette sélection définit le répertoire des cellules T matures CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. La sélection positive retient les cellules dont le TCR est capable de reconnaître un antigène présenté par le CMH du soi. La sélection négative élimine les cellules T auto-réactives. A ce stade du développement des lymphocytes T, Syk n'est plus en mesure de compenser la déplétion de ZAP-70 et chez les souris Syk<sup>-/-</sup> leur développement s'arrête au stade DP. La perte d'expression de Syk dans les cellules DP ne permet aucune compensation dans des thymocytes DP, entravant ainsi la sélection positive et négative [98] [99].

### 1.2.2. Syk dans la signalisation du TCR

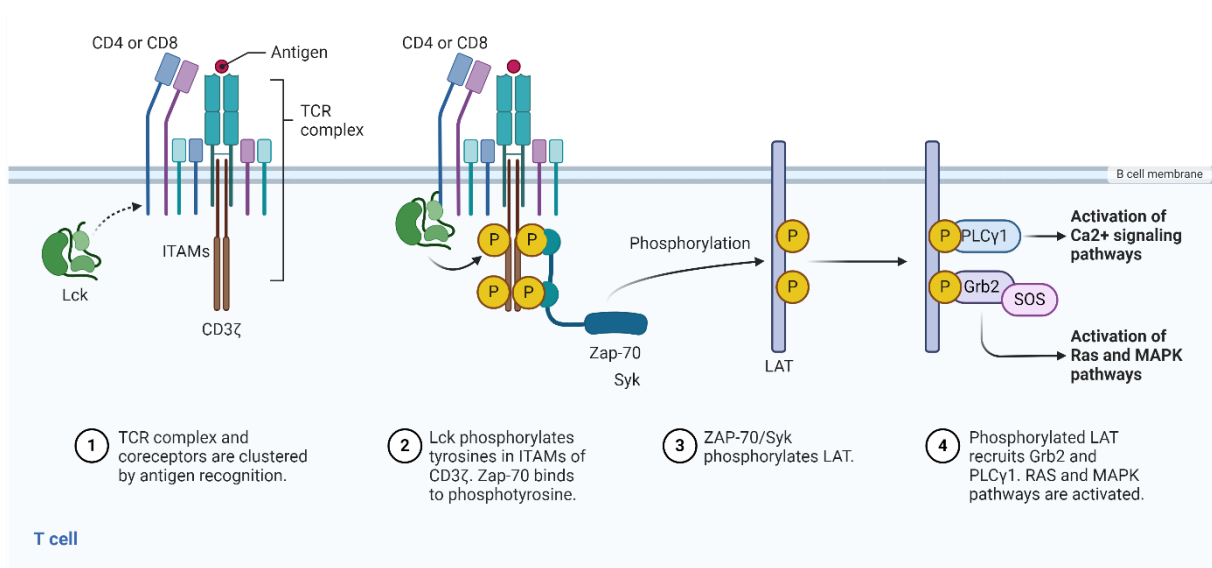


Figure 12: *Modèle d'activation et de signalisation du TCR: En réponse à une stimulation antigénique, la signalisation commence par le recrutement des Src-kinases qui phosphorylent les motifs ITAMs du complexe TCR. S'ensuit une réaction en chaîne aboutissant à l'activation des voies de signalisation telles que celle du calcium ou des MAPK. Adapté de [101].*

Les signalisations du pré-TCR et du TCR mettent en jeu deux familles de PKs à savoir celles des Src-kinases (Lck, Fyn) et des Syk-kinases (Syk, ZAP-70) (figure 12). En réponse à une stimulation antigénique, les Lck associées aux co-récepteurs CD4 et CD8 s'agrègent autour des motifs ITAMs portés par la chaîne zeta du CD3 du complexe TCR. Cette proximité de ces molécules facilite la phosphorylation des résidus tyrosine des ITAMs qui servent de sites d'ancrage aux domaines SH2 des kinases de la famille Syk. Ces dernières sont à leur tour activées par phosphorylation (pour ZAP-70) et/ou autophosphorylation (pour Syk) par les Src-kinases, dont Lck qui lie Syk et ZAP-70 grâce à son domaine SH2. Les kinases Syk activées sont ensuite en mesure de phosphoryler des effecteurs en aval tels que LAT Cbl, SLP-76, Vav ou la PLC $\gamma$ . Il en résulte la transduction du signal dont l'issue est l'activation de voies de signalisation telles que celles du calcium ou des MAP-kinases responsables de la prolifération, l'activation et le développement des cellules T [98].

### 1.3.Syk avec les autres récepteurs à motifs ITAM

Le rôle de Syk en tant qu'acteur clé dans le système immunitaire ne se limite pas qu'aux BCR ou au TCR mais s'étend à d'autres récepteurs comme les FcRs ou les récepteurs lectines de type C (CLR) (Figure 13).

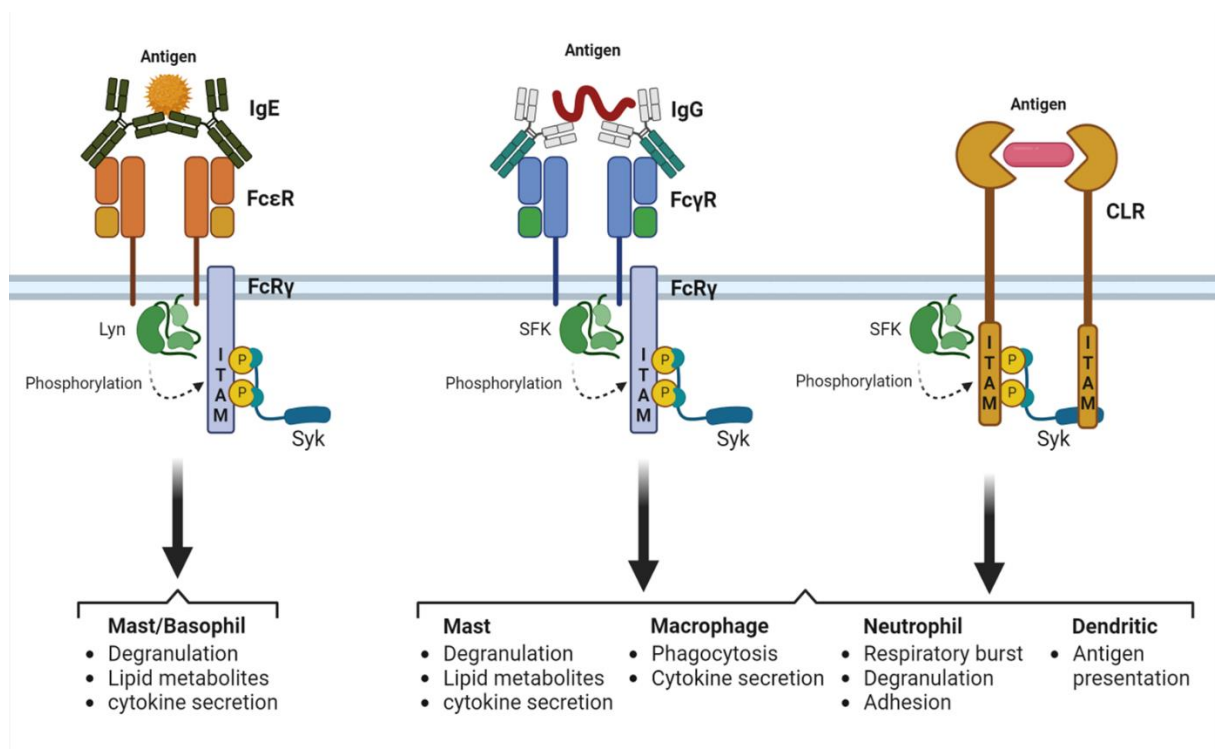


Figure 13 : *Syk dans la signalisation des récepteurs à motifs ITAM dans les cellules de l'immunité innée. La reconnaissance d'un motif antigénique se traduit par la phosphorylation des motifs ITAM des sous-unités cytoplasmiques des récepteurs. Les ITAMs phosphorylés servent de site d'ancrage à Syk qui active des voies de signalisation aboutissant à des réponses biologiques diverses. (Adapté selon [102]).*

### 1.3.1. Dans les cellules myéloïdes

Les FcR sont des récepteurs capables de reconnaître les fragments Fc des anticorps et modulent la réponse immunitaire par le signal qu'ils transduisent. Leur fonction, généralement activatrice, varie selon l'isotype d'immunoglobuline reconnu. Selon le type de FcR activé, le signal qu'ils génèrent engendre des réponses cellulaires variées [103] allant de la dégranulation à la présentation d'antigènes. Dans les cellules dendritiques notamment, ces réponses cellulaires sont régulées par l'activation antigénique des CLR exprimés à la membrane. Que ce soient les FcR ou les CLR, leur signalisation passe par la phosphorylation de résidus tyrosine situés dans leurs ITAMs par les Src-kinases. Ces sites phosphorylés sont reconnus par Syk qui contrôle l'activation de voies de signalisation qui initient des réponses cellulaires variant d'un type cellulaire à l'autre avec un impact sur la réponse immunitaire innée [104] [102].

Au cours de la réponse inflammatoire, l'activation des mastocytes par le FcεRI se traduit par des réponses cellulaires telles que la dégranulation, la sécrétion de cytokines ou de métabolites de l'acide arachidonique. Le FcεRI est un FcR de haute affinité pour l'IgE. Ce récepteur est un assemblage de sous-unités α, d'une chaîne β reconnue par les Src kinases et d'un dimère γ doté chez la souris d'un motif ITAM reconnu par Syk (Figure 13). La déplétion de Syk dans des cellules murines inactive la voie calcique et empêche l'activation de la PLCγ. De plus, la dégranulation et la production de cytokines dépendent de Syk. En effet, cette dépendance a été montrée suite à l'expression d'un mutant de Syk, dont les deux domaines SH2 ont été tronqués, dans une lignée mastocytaire de rat (RBL-2H3) invalidée pour le gène Syk [105] [106].

Syk intervient aussi dans la signalisation des récepteurs FcγRs exprimés à la surface des macrophages. Elle permet notamment la phagocytose et la destruction par le système immunitaire de corps étrangers tels que les bactéries ou les parasites. L'impact de Syk dans ces fonctions macrophagiques a été démontré dans un modèle de co-expression de Syk et du récepteur FcγRI ou d'une protéine de fusion Syk-FcγRIII dans la lignée cellulaire COS-1 qui conduit à une potentialisation de la phagocytose. Cet effet est aboli dans la lignée COS-7 par l'introduction d'une mutation affectant le domaine kinase de Syk par un changement du résidu acide aspartique en position 489 par un résidu asparagine. Cette mutation altère le domaine VI du domaine catalytique de Syk contenant un motif hautement conservé et impliqué dans la reconnaissance de la tyrosine cible à phosphoryler par Syk. *In vitro*, des macrophages n'exprimant plus Syk présentent des défauts de la fonction phagocytaire qui est dépendante des FcγR. Toutefois, elles gardent leur fonction dépendante du complément qui est un acteur du système immunitaire inné regroupant un ensemble de plus de trente protéines solubles et membranaire reconnues par les macrophages [107] [108] [109].

Dans les neutrophiles, Syk est requis à la signalisation des FcRs mais aussi à celle des intégrines. Des neutrophiles issus de souris Syk<sup>-/-</sup> présentent une incapacité à produire des dérivés réactifs de l'oxygène en réponse à une stimulation du FcγR. La production de ces dérivés représente une phase critique de la réponse immunitaire puisqu'ils interviennent dans la défense antimicrobienne dont les neutrophiles sont en charge [110]. Un mutant de Syk, incapable de lier les ITAMs phosphorylés du FcγR, montre des défauts d'activation qui dépendent des intégrines dans les neutrophiles. Ces cellules Syk<sup>-/-</sup> montrent une absence d'explosion

oxydative « oxydative burst », de dégranulation et de spreading en réponse à la stimulation des intégrines [111] [112].

L'intérêt porté au rôle de Syk dans les plaquettes découle du phénotype observé chez les souris Syk<sup>-/-</sup> présentant une sévère hémorragies dans de nombreux organes (Turner Nature 1995, Cheng Nature 1995). Les études suivantes ont écarté l'absence de Syk dans ces plaquettes comme une cause de cette hémorragie et ont permis d'impliquer Syk dans la signalisation de différents récepteurs, dont celle du récepteur au collagène GPVI. Cette signalisation est nécessaire à l'activation des plaquettes dans la formation de thrombus. Par ailleurs, il a été rapporté que Syk est exprimée sous ses deux formes, Syk-S et Syk-L, dans les plaquettes. La différence majeure entre ces deux isoformes réside dans la présence de sites de phosphorylation sur Syk-L et leur absence sur Syk-S. La présence de ces sites, à savoir le résidu tyrosine 290 et les résidus sérines 289 et 291, suggèrerait que la forme longue de Syk est soumise à régulation dans les plaquettes alors que la forme courte de Syk l'est moins ; cette régulation correspondrait à des besoins fonctionnels de la cellule qui restent à explorer [113].

### 1.3.2. Dans les cellules non hématopoïétiques

L'impact fonctionnel de Syk va au-delà des cellules hématopoïétiques. La plupart des cellules met en jeu un système de signalisation dans lequel les motifs ITAM des récepteurs servent d'interrupteurs de signaux par le recrutement et l'activation de Syk. Comme évoqué dans la signalisation des neutrophiles déclenchée par les intégrines ou des plaquettes par les récepteurs au collagène, Syk régule la fonction de multiples types cellulaires non hématopoïétiques qui partagent les mêmes récepteurs.

Syk est exprimée dans les fibroblastes humains dont ceux de la cavité nasale. Dans ces cellules, l'expression de Syk est corrélée positivement à la production de RANTES, une chimiokine impliquée dans le chimiotactisme lors des réponses inflammatoires. Une surexpression de Syk augmente la production de RANTES dans ces fibroblastes stimulés par des lipopolysaccharides (LPS) alors que l'inhibition de l'expression de Syk diminue cette production. La protéine Syk est aussi impliquée dans la différenciation des fibroblastes embryonnaires de souris 3T3-L1 en adipocytes. L'induction de l'adipogénèse conduit à l'augmentation de la phosphorylation et de l'activité de Syk après de 24 h [114] [115].

L'expression de Syk est également retrouvée dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, de rat et de souris et dans les lignées humaines HS-24 et BEAS-2B. En réponse à une stimulation des récepteurs à l'intégrine-beta 1 par de la fibronectine, Syk est recrutée à la membrane plasmique et est phosphorylée. Cette signalisation contribue à la synthèse de la molécule d'adhésion ICAM-1 et à la production de l'interleukine pro-inflammatoire, l'IL-6 ; les deux étant importantes dans le processus d'inflammation du poumon. L'inhibition de l'activité de Syk par un agent thérapeutique ou de son expression par un SiRNA réduit la production de ces molécules [116]. Syk est aussi retrouvée dans l'épithélium mammaire humain physiologique, dans des lésions bénignes du tissu épithélial mammaire, des hyperplasies bénignes et son expression diminue au cours de la transformation tumorale [117].

Dans le foie, Syk joue un rôle important dans les lésions hépatiques aiguës, les stéatoses ou les inflammations. Il régule l'activation de P38 dans les inflammations aiguës du foie en réponse à une stimulation avec du TNF des hépatocytes [118]. Dans ces cellules, Syk est hautement phosphorylé lorsqu'elles sont stimulées avec de l'angiotensine II qui se lie aux récepteurs couplés aux protéines G. L'inhibition de l'activité de Syk au cours de cette stimulation bloque la phosphorylation des MAP kinases, démontrant le rôle de Syk dans l'activation de cette voie de signalisation [119].

La protéine Syk est retrouvée dans les neurones de différentes structures du cerveau à savoir le cervelet, l'hippocampe, les systèmes visuel et olfactif. Chez le rat, son expression est observée dans les cellules formant le système visuel dès le 16<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire et persiste jusqu'à l'âge adulte. Elle existe dans un état de phosphorylation important sur des résidus activateurs dans plusieurs populations neuronales spécialisées [120]. Syk est impliquée dans la différenciation neuronale de la lignée cellulaire P19, issue du carcinome embryonnaire de souris. Sa surexpression dans cette lignée augmente l'activation des MAP kinases et le neurite qui est la projection cellulaire des neurones donnant naissance aux axones ou aux dendrites.

Le rôle de Syk a été démontré dans les cellules endothéliales par l'étude des souris Syk<sup>-/-</sup> qui présentent des anomalies du développement des réseaux vasculaire et lymphatique. Les deux réseaux présentent des défauts de séparation physiques qui se manifestant par la formation de vaisseaux chimériques composés d'un mélange de cellule endothéliales vasculaires et lymphatiques qui sont la cause d'une hémorragie systémique sévère chez les souris Syk<sup>-/-</sup> [62].

Ces données montrent l'importance de Syk dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales.

Un autre type cellulaire dans lequel Syk semble avoir un rôle est celui des ostéoclastes. Une déplétion ciblée de Syk dans des ostéoclastes ou des cellules hématopoïétiques montrent une augmentation de leur densité trabéculaire osseuse avec un phénotype plus sévère chez la souris déplétée dans leurs cellules hématopoïétiques. Dans le modèle Syk<sup>-/-</sup>, les ostéoclastes ne se développent pas *in vitro* et présentent une plus faible capacité de résorption de l'os. La différence phénotypique entre les deux modèles s'explique par la temporalité de la déplétion de Syk qui a plus d'impact négatif lorsqu'elle survient dans les progéniteurs précoces des ostéoclastes ; notamment la souris ayant des cellules hématopoïétiques Syk<sup>-/-</sup> [121] [122].

## Chapitre 3 : Syk et physiopathologie

Syk est impliquée fonctionnellement dans le système immunitaire comme effecteur essentiel de la signalisation de plusieurs classes de récepteurs de la reconnaissance immunitaire et d'autres types cellulaires (*cf.* ci-dessus). Cette diversité de rôles physiologiques suggère que Syk puisse être à l'origine de diverses pathologies chez l'homme. La littérature a montré que sa surexpression pouvait amplifier les signaux qu'elle transduit, alors que l'absence de son expression pouvait les affecter. D'autres mécanismes liés à Syk et entraînant des pathologies, proviennent de l'expression aberrante de protéines de fusion de Syk ou de mutations du gène *SYK*. L'ensemble de ces mécanismes renforce l'intérêt pour Syk comme potentielle cible thérapeutique dans le traitement des patients [123].

### I. Syk comme promoteur de tumeur

#### 1. Surexpression et activation constitutive de Syk

Une des dérégulations de l'expression de Syk causant des pathologies est sa surexpression qui peut être due à une duplication du gène Syk. Celle-ci mène à une activation constitutive des voies de signalisation des récepteurs membranaires impliquant Syk comme effecteur et dont la réponse biologique altérée conduit à l'augmentation de la survie dans la plupart des cellules tumorales. A l'inverse, une inhibition de Syk provoque leur apoptose. Le comportement pro-tumoral de Syk est notamment décrit dans les cancers affectant les lymphocytes B et s'étend à d'autres pathologies impliquant des cellules non-hématopoïétiques (*Cf.* Tableau 1).

[124] [123].

Tableau 1: *Liste des pathologies cancéreuses dans lesquelles Syk est un promoteur de tumeurs (selon (M.O. Krisenko, 2015)). Activation constitutive : L'activation de Syk est continue dans les cellules tumorales et ne nécessite pas de stimuli externes ; Surexpression : La synthèse protéique de Syk est excessive dans les cellules tumorales et résulte généralement*



*d'une dérégulation de la transcription ou de la traduction de son gène. Syk et survie cellulaire impliquant l'axe PI3K-AKT.*

Type de cancer	Observation	Références
<b>Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B)</b>	Activation constitutive de SYK. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[125] ; [126] ; [127]
<b>Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)</b>	Activation constitutive de SYK, augmentation du nombre de copie du gène. L'inhibition de SYK induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle.	[128] ; [129], [130]
<b>Lymphome folliculaire (LF)</b>	L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[131]
<b>Lymphome de la cellule du manteau (LCM)</b>	Surexpression de SYK suite à l'amplification du gène. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[132]
<b>Lymphome de la zone marginale (LZM)</b>	Augmentation de l'expression de SYK.	[133]
<b>Leucémie lymphoblastique aigüe B (LLA-B)</b>	Activation constitutive de SYK. Les inhibiteurs de SYK bloquent la prolifération tumorale.	[134] ; [135] ; [136]
<b>Lymphome des cellules T périphériques (PTCL)</b>	Activation constitutive de SYK. Protéine de fusion TEL-SYK.	[137] ; [138]
<b>Virus Epstein-Barr + désordre lymphoprolifératif (PTLD)</b>	Activation de SYK par LMP2A. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[139]
<b>Leucémie aigüe myéloïde (LAM)</b>	Activation de SYK par les intégrines. L'inhibition de SYK diminue la prolifération et induit la différenciation	[140] ; [141] ; [142]
<b>Carcinome nasopharyngien</b>	Activation de SYK par LMP2A.	[143]
<b>Cancer du sein HER2 positif</b>	Activation de SYK par C35.	[144]
<b>Cancer du pancréas</b>	Cellules dépendantes de K-RAS. Supprimer SYK induit l'apoptose	[145]
<b>Cancer du poumon</b>	Cellules dépendantes de K-RAS. Supprimer SYK induit l'apoptose.	[145]
<b>Rétinoblastome</b>	Expression de SYK dans les cellules tumorales, absent du tissu normal. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[146]

<b>Cancer de l'ovaire</b>	L'expression de SYK augmente avec la progression tumorale. L'inhibition de SYK induit l'apoptose.	[147]
<b>Cancer de poumon à petites cellules (SCLC)</b>	Forte expression de SYK dans les tumeurs. L'extinction de SYK induit l'apoptose.	[148] ; [149]
<b>Carcinome squameux de la tête et du cou (SCCHN)</b>	La forte expression de SYK stimule la motilité cellulaire.	[150]

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à résister à l'apoptose. Elle se traduit par la dérégulation de voies de signalisation apoptotiques qui leur confère un avantage de survie. Cela favorise le développement de multiples résistances des cellules cancéreuses aux traitements. Syk a été proposée comme un promoteur de tumeurs en favorisant les voies pro-survie des cellules tumorales suite à l'activation de l'axe PI3K-AKT (Figure 14).

Au cours du développement et de la maturation des cellules B, la co-ligation du BCR et de son corécepteur, le CD19, active l'axe PI3K-AKT qui favorise la survie des lymphocytes en inhibant l'expression de facteurs pro-apoptotiques, tels la protéine p130 ou la cycline G2 ; toutes deux impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire [151]. Cette voie de transduction du

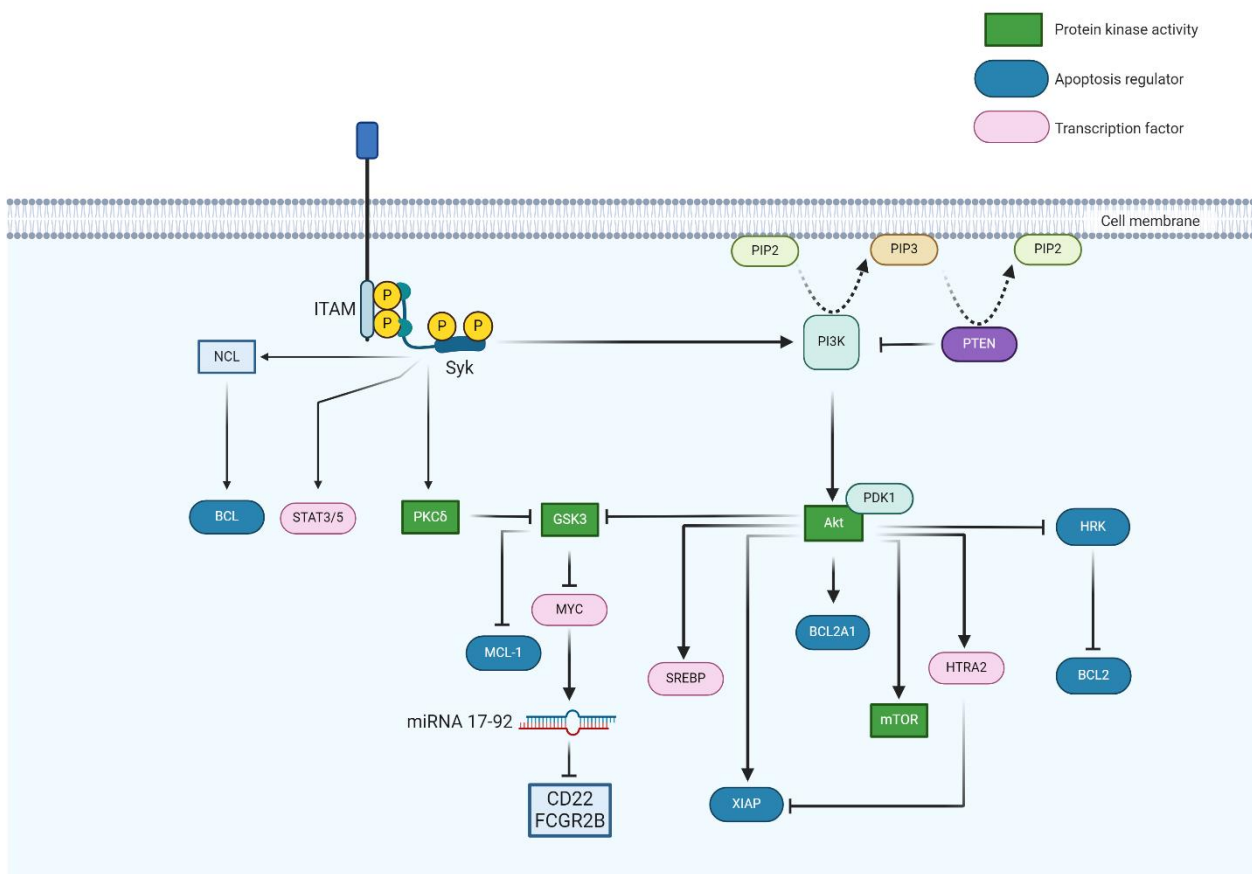


Figure 14 : *Mécanismes de survie cellulaire favorisée par SYK et impliquant l'axe PI3K-AKT. Suite à son recrutement au niveau des motifs ITAMs phosphorylés, Syk active des voies de survie en modulant l'activité de protéines kinases impliquées dans la régulation de facteurs pro- et anti-apoptotique dont l'effet biologique se traduit par l'activation de facteurs de transcription. (Adapté selon [124]).*

signal peut, à elle seule, compenser la survie des cellules B en cas de perte de la signalisation du BCR, par une activation constitutive de la PI3K ou une délétion de PTEN [152]. Cette altération de PTEN abolit son impact inhibiteur sur la PI3K et permet l'activation d'AKT qui induit la survie des cellules B (Figure 14).

### 1.1.Syk dans les voies de survie

#### *La survie médiée par MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia-1)*

Dans les cellules B de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), l'augmentation de la phosphorylation d'AKT, qui est dépendante de Syk, inhibe la GSK3 par phosphorylation. Cet événement lève la répression qu'exerce GSK3 sur MCL-1 suite à sa phosphorylation sur le résidu sérine 159 qui entraîne un ciblage de MCL-1 par des ubiquitines ligases et sa reconnaissance par le protéasome. MCL-1 est un facteur de pro-survie des cellules B de LLC appartenant à la famille BCL-2 dont l'inhibition de l'expression par siRNA conduit à la mort des cellules tumorales *in vitro* [153] [154]. Cependant, l'expression de MCL-1 peut être récupérée par des voies alternatives. Dans les cellules B de LLC, Syk active la PKC $\delta$ , un effecteur en aval, qui permet la stabilisation de MCL-1 *via* une phosphorylation inhibitrice de la GSK3 par AKT [155]. Cet effet pro-tumoral de Syk passant par AKT se confirme dans d'autres cancers, tel que le rétinoblastome où Syk permet également la stabilisation de MCL-1 [156].

#### *La survie médiée par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)*

L'un des effecteurs de l'axe PI3K-AKT est la protéine mTOR, un acteur crucial de la signalisation du TCR dans les cellules T et qui est aussi considérée comme un promoteur de tumeur [157]. mTOR est une serine/thréonine kinase appartenant aux kinases associées à la famille des PI3K (PIKK) jouant un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires fondamentales comme la croissance, la synthèse protéique, l'autophagie ou la régénération [158]. Cette protéine est fréquemment dérégulée dans le cancer humain et est une cible thérapeutique. Le

ciblage de cet axe de signalisation dans la Leucémie Myéloïde Aiguë (LAM) par des inhibiteurs de Syk, ou une déplétion de Syk avec un shRNA, abolissent les fonctions de mTOR qui est constitutivement active. Ces résultats montrent un impact de Syk dans la régulation de mTOR dans la LAM qui, lorsqu'il est couplé à l'inhibition d'autres effecteurs de la voie PI3K, tel que AKT, ont un effet synergique sur la viabilité des cellules et leur capacité à se différencier [159].

### *La survie médiée par SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins)*

Dans le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL), la signalisation du BCR établit une boucle de rétrocontrôle dans laquelle la signalisation PI3K, qui résulte de la signalisation du BCR soutenue par Syk, permet la synthèse de cholestérol. Ce dernier s'accumule à la membrane plasmique et amplifie la signalisation du BCR par un regroupement des récepteurs à l'antigène dans les radeaux lipidiques. Le cholestérol est un produit issu de l'axe PI3K-AKT qui active le facteur de transcription SREBP. Ce dernier promeut l'expression d'enzymes responsables du métabolisme du cholestérol, notamment celles impliquées dans sa synthèse [130].

### *La survie médiée par MYC*

Le rôle de Syk, en tant que promoteur de tumeur et passant par l'axe de survie PI3K-AKT, est aussi illustré par sa contribution dans l'accumulation de la protéine MYC. Cette dernière regroupe un ensemble de protéines régulant plus de 15% du génome humain. Elle a un rôle de modulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans divers processus cellulaires, notamment le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse, le métabolisme, la réparation de l'ADN, la traduction des protéines, la formation de cellules souches ou la réponse immunitaire [160]. L'activation de ce proto-oncogène résulte de l'inhibition de la GSK3 qui le réprime par phosphorylation qui est l'une des modifications post-traductionnelles régulant sa stabilité. Quand il est présent, MYC induit un groupe de micro-ARNs, les miR17-92. Ces derniers répriment l'expression du CD22 et du FcγRIIb, qui sont deux récepteurs à motifs ITIM qui recrutent les phosphatases SHP1 et SHIP1, des régulateurs négatifs de la signalisation du BCR (Figure 14). Ainsi, Syk est un régulateur positif de la signalisation du BCR en agissant sur l'axe PI3K-AKT par le blocage de la voie de régulation négative du BCR [161] [162].

## 1.2. Les autres voies de la survie

### *La nucléoline*

D'autres voies de survie, que Syk emprunte en dehors de l'axe PI3K-AKT, existent dans les cellules cancéreuses comme le DLBCL, le lymphome de Burkitt ou le carcinome mammaire. Dans ces pathologies, Syk interagit avec la nucléoline qui est une protéine localisée dans tous les compartiments cellulaires et qui est impliquée dans une multitude de processus biologiques, dont la transcription, l'épissage, la stabilité, le transport et la traduction de nombreux ARNm [163]. La liaison de Syk à la nucléoline (NLC) entraîne la phosphorylation de NLC, augmentant sa capacité de liaison à l'ARNm de la protéine anti-apoptotique BCL-XL. Dans une étude montrant l'interaction entre Syk et la nucléoline, la réduction du niveau de nucléoline par siRNA atténue la capacité protectrice de Syk des cellules vis-à-vis de la mort cellulaire induite par stress oxydatif [164]. Le modèle décrit de cette étude suggère que l'association de Syk avec la nucléoline est indépendante de l'activité kinase de Syk puisqu'elle se déroule en absence de toute activation de Syk ou de phosphorylation des deux partenaires. Des études de mutagenèse dirigée semblent par ailleurs indiquer l'implication des propriétés adaptatrices de Syk dans la régulation de cette interaction. En effet, l'absence de phosphorylation des résidus tyrosines 342 et 346 retrouvés dans l'IDB de Syk permet de maintenir l'interaction avec la nucléoline alors qu'elle est perdue lorsqu'ils sont phosphorylés. Ces tyrosines sont les sites préférentiels d'interaction des protéines ayant un domaine SH2 avec Syk. Dans ce modèle la phosphorylation de ces résidus générerait des sites d'ancrage de haute affinité à des protéines conduisant à la dissociation du complexe Syk-NLC.

### *Les protéines de la famille STAT*

Une autre voie de survie des cellules tumorales, qui est dépendante de Syk, met en jeu les protéines de la famille STAT (signal transducer and activator of transcription) dont Syk module la fonction par phosphorylation. Les facteurs de transcription STAT3 et STAT5 sont notamment impliqués. Dans les cellules primaires de LAM, ces STATs, le récepteur à l'intégrine Mac-1 et le FcR $\gamma$  interagissent avec Syk comme le montrent les résultats d'une analyse protéomique. Syk et STAT3/5 sont constitutivement activées par le signal tonique dépendant du FcR $\gamma$ . Cet état d'activation de STAT3 et STAT5 qui dépend de Syk provoque la survie et la prolifération cellulaires [142] [165].

### 1.3.Syk et LLC

La LLC est l'une des leucémies les plus fréquentes de notre monde occidental et affecte majoritairement les personnes âgées. Elle s'exprime principalement chez les patients sous deux formes : indolente et progressive. Cette hémopathie est définie par sa résistance à l'apoptose qui permet le développement d'un clone de cellules B matures et une accumulation des cellules tumorales qui prolifèrent dans le sang, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques des patients [166]. L'expansion clonale des cellules B de LLC a lieu dans les compartiments ganglionnaire et médullaire [167] ; [168]. Ces lymphocytes B tumoraux circulants présentent une signature phénotypique comprenant les marqueurs de surface de cellule B, CD19, CD20 et CD23 et le CD5, aussi exprimé par les cellules T. Elles présentent un faible niveau d'expression des immunoglobulines (Ig) à leur surface (BCR) comparé à celui des cellules B normales [169] [170]. Les BCR de la LLC présentent un biais d'utilisation des gènes variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGHV), dominé par la présence de combinaisons particulières de gènes IGHV et IGLV. Les BCR codés par ces combinaisons IGHV/IGLV sont retrouvés dans un tiers des cas de LLC, alors qu'ils ne sont que rarement observés dans les lymphocytes B normaux. Ce biais du répertoire des BCR est une preuve que les cellules de la LLC sont sélectionnées en raison de leurs propriétés particulières de liaison à l'antigène [171]. Le statut mutationnel de ces Ig est le principal facteur pronostique. En effet, le groupe de patients ayant une forme indolente de la pathologie ont des cellules B de LLC qui expriment majoritairement un gène IgHV muté alors que le groupe de patients développant une forme agressive de la maladie possède des lymphocytes B tumoraux qui expriment un gène IgHV non muté. En plus d'exprimer un BCR autoréactif [172], les cellules leucémiques de ce dernier groupe expriment de façon aberrante la protéine ZAP-70.

La co-expression de Syk et Zap-70 est un événement rare dans les cellules B ou T physiologiques chez l'homme [173]. Cependant, ZAP-70 est exprimée de manière ectopique dans plusieurs hémopathies B. Dans la LLC, son rôle a longtemps été limité à sa fonction adaptatrice en contribuant positivement à la voie du BCR [126]. Il a ensuite été montré que les cellules B de LLC exprimant ZAP-70 montrent un avantage prolifératif par rapport à celles qui ne l'expriment pas en réponse à une stimulation du BCR [174]. Récemment, il a été montré qu'elle participe à la signalisation du BCR et permet aux cellules B auto-réactives au stade pro-B et aux clones pré-tumoraux d'échapper à une sélection négative [126] [95]. Les cellules B de LLC sont caractérisées par une surexpression de Syk qui est constitutivement activée [125] [175] et par une expression ectopique de Zap-70. Au cours du processus de tumorigénèse, une

compétition s'installe entre Syk et ZAP-70 pour lier les composants du signalosome du BCR. ZAP-70 interfère avec la signalisation passant par la voie calcique et favorise la voie PI3K. Ces deux mécanismes permettraient la subversion des mécanismes de la sélection négative (ex : anergie) conduisant à l'élimination des clones de lymphocytes B autoréactifs et pré-tumoraux. Il en résulterait ainsi une signalisation persistante du BCR des cellules B autoréactives ou une activation oncogénique des voies du BCR augmentant la survie des cellules tumorales. (Figure 15).

Tout en maintenant une signalisation du BCR, la co-expression de Syk et ZAP-70

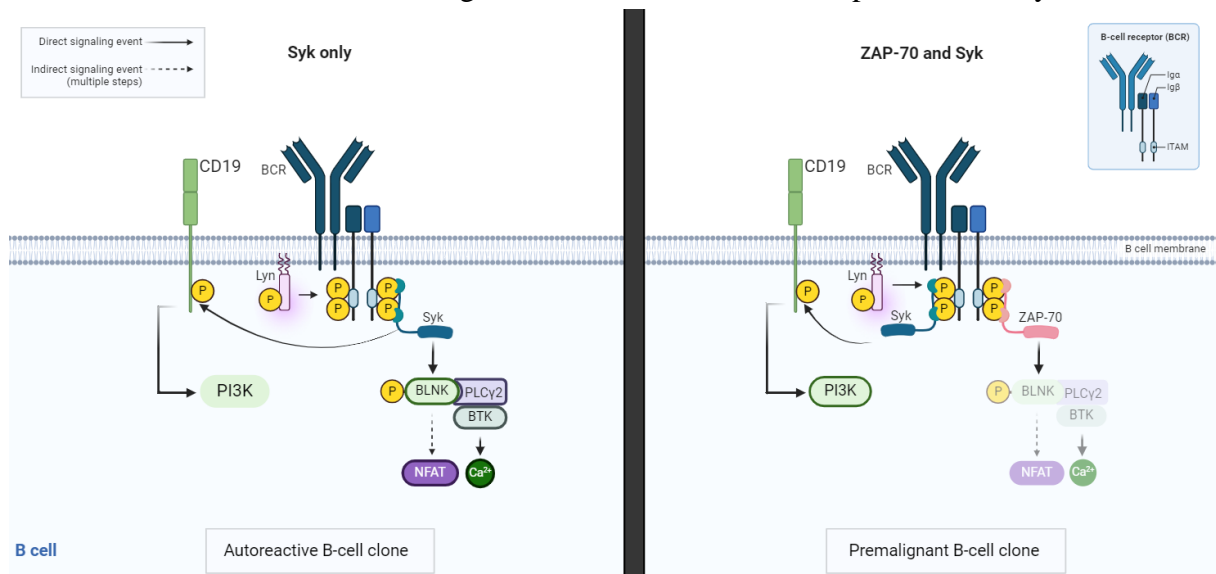


Figure 15: *Impact fonctionnel de l'expression de ZAP-70 dans la signalisation du BCR : Les cellules B auto-réactives échappent à l'anergie et à l'apoptose en activation la voie de survie CD19-PI3K en réponse à une signalisation chronique du BCR. Dans les cellules en transformation maligne, ZAP-70 est exprimée de façon aberrante. Cette dernière se substitue à Syk dans la signalisation du BCR en redirigeant Syk vers la voie du CD19 pour activer les effecteurs PI3K-AKT qui augmentent la survie des cellules cancéreuses (Adapté de [95]).*

contribue à la désactivation des mécanismes de sélection négative des clones de cellules B auto-réactives ou pré-cancéreuses [95] [173]. De manière intéressante, une forte expression de Syk est retrouvée dans des lymphomes T agressifs, suggérant que Syk puisse être impliquée dans la survie des cellules T tumorales [95].

Au cours de la tumorigénèse des cellules B de LLC, la réactivité des BCR avec des auto-antigènes ou des antigènes étrangers pourrait expliquer l'activation chronique de la voie du BCR, dont l'activation constitutive de Syk [169]. La diminution de l'expression de Syk (SiRNA ou ShRNA) ou l'inhibition de l'activité de Syk (R406) montrent que son activation est liée à une inhibition de l'apoptose spontanée [155], suggérant son rôle dans la survie des cellules tumorales. En effet, l'activation constitutive de Syk induite par le BCR augmente la protéine anti-apoptotique MCL-1 en activant la voie PI3K/AKT [127]; [176]; [177]). De plus, les



niveaux d'expression et de phosphorylation de Syk dans les cellules B de LLC semblent liés à leur avantage de survie suite à une stimulation antigénique qui est inversement corrélé à la survie globale des patients [175]. Des études précliniques *in vitro* et *in vivo* ont identifié Syk comme une cible prometteuse pour le traitement de la LLC et d'autres tumeurs malignes à cellules B. En effet, l'inhibition de Syk interfère avec les effets pro-survie qui dépendent ou non du BCR dans le microenvironnement tissulaire. De plus, le fostamatinib (une pro-drogue orale du R406) prévient la progression de la maladie chez les souris transgéniques TCL1, chez lesquelles la sélection dépendante de l'antigène semble jouer un rôle similaire à celui de la LLC humaine. En plus du Fostamatinib, d'autres inhibiteurs de Syk ont été développés, comme l'Entospletinib, et montrent une activité dans les essais cliniques sur des patients en rechute thérapeutique [169].

### 1.3.1. Dans les autres hémopathies B

La signalisation chronique du BCR, accompagnée d'une phosphorylation basale et d'une activation de Syk, se retrouvent dans plusieurs hémopathies B. Parmi ces dernières figurent le DLBCL, le lymphome de Burkitt (BL), le lymphome folliculaire (FL), le lymphome à cellules du manteau (MCL), le lymphome de la zone marginale (MZL) et la macroglobulinémie de Waldenstrom (WM) (Figure 16).

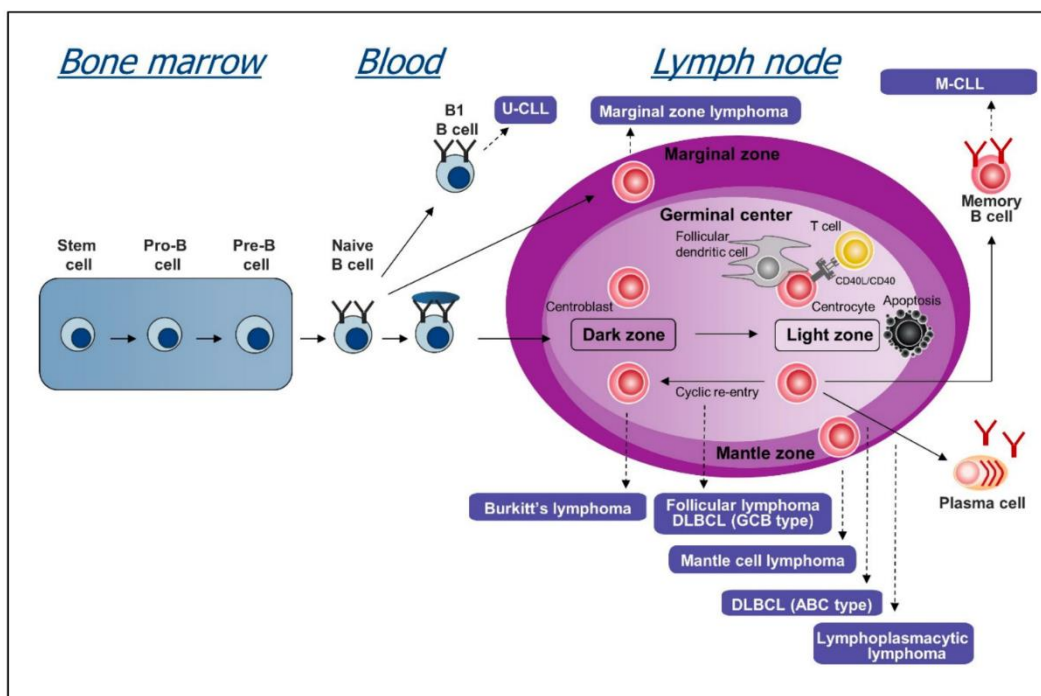


Figure 16: *Développement des cellules B et cellules à l'origine des hémopathies B.* [169].

Le DLBCL est une maladie caractérisée par une forte charge mutationnelle. Cette complexité génétique est responsable d'une hétérogénéité phénotypique et de la réponse aux traitements. Une première classification a identifié deux sous-types distincts de DLBCL appelés Germinal Center B-like (GCB) et Activated B cell-like (ABC) DLBCL, qui représentent des lymphomes issus de différents stades de la différenciation lymphoïde (Figure 16). Par ailleurs, une autre classification des DLBCL a été proposée, qui distingue les DLBCL qui dépendent du BCR pour leur survie (dépendants du BCR, contenant à la fois les DLBCL ABC et GCB) des DLBCL qui évoluent par d'autres mécanismes pathogéniques. Ces deux sous-groupes diffèrent par leur mécanisme d'activation du BCR ; un mécanisme dépendant de l'antigène déclenchant un signal BCR « actif chroniquement » qui active à la fois NF- $\kappa$ B et PI3K pour les DLBCL ABC et un mécanisme indépendant de l'antigène entraînant un signal BCR « tonique » exagéré qui n'active que PI3K pour les DLBCL GCB.

Cette différence de signaux pourrait être liée aux niveaux d'activation différentielle de Syk entre les deux sous-groupes. En effet, Syk est majoritairement phosphorylée sur son résidu tyrosine 352 dans des cellules DLBCL GCB non stimulées, et sa phosphorylation sur ses résidus tyrosine 525/526 augmente après engagement du BCR avec un ligand [178].

Sachant que la phosphorylation de Y352 et YY525/526 représente deux étapes consécutives dans l'activation de Syk (voir ci-dessus), sa phosphorylation sur les résidus YY525/526 est associée à une forte augmentation de l'activation de PLC $\gamma$ 2 et à une moindre augmentation de l'activation d'AKT. Sachant que PLC $\gamma$ 2 est requis à l'activation de NF- $\kappa$ B, cela pourrait expliquer l'activité plus élevée de NF- $\kappa$ B dans les lignées cellulaires ABC dépendantes du BCR par rapport aux lignées cellulaires GCB DLBCL dépendantes du BCR.

Dans certaines cellules primaires issues du DLBCL, la surexpression de Syk peut résulter d'une augmentation du nombre de copies du gène Syk [130]. Dans ces cellules, Syk est localisée à la membrane plasmique au niveau du complexe du BCR [179] [180]. Cette kinase est constitutivement phosphorylée sur des résidus impliqués dans son processus d'activation (Y352, Y525/526) qui conduit à une signalisation tonique ou chronique du BCR. Cet état de phosphorylation de Syk est retrouvé dans plus de 40% des cas de DLBCL. De manière intéressante, la déplétion de BCL6 augmente l'expression de la phosphatase PTPROt qui régule négativement la phosphorylation de Syk et de la protéine adaptatrice en aval, BLNK [181].

Dans le DLBCL, l'inhibition de Syk a été effectuée *in vitro* et *ex-vivo* par des moyens pharmacologiques, tels que le R406, R788 ou PRT318 qui se fixent dans le domaine catalytique de la kinase, ou génétiques, tels que des shRNA ou siRNA qui diminuent le niveau de protéine. Il est à noter que l'inhibition de Syk est cytotoxique ou cytostatique pour la plupart des cellules

DLBCL qui sont BCR-dépendantes alors que la déplétion de Syk par SiRNA arrête leur cycle cellulaire. Sur la base de ces données, des patients DLBCL en rechute ont été traités avec le Fostamatinib et le taux de réponse au traitement est de 22% [182]. L'ensemble de ces travaux confirment le rôle de Syk dans la signalisation tonique et chronique du BCR dans la tumorigenèse [124] [169].

La dérégulation de l'expression ou de l'activation de Syk a été rapportée dans d'autres pathologies touchant les cellules B comme le lymphome folliculaire (FL), le lymphome à cellules du manteau (MCL) ou le lymphome de la zone marginale (MZL). Comparées aux cellules B normales retrouvées dans les infiltrations tumorales, les cellules B du FL répondent plus fortement et plus durablement à une stimulation du BCR comme le montrent les niveaux de phosphorylation des effecteurs de la voie, tels que Syk, BTK et Erk [183]. Dans le MCL, l'augmentation de la transcription du gène de Syk entraîne fréquemment sa surexpression dans les cellules primaires de patients et de lignées, telles que les cellules JeKo-1. Dans le MZL, des études ont avancé l'hypothèse selon laquelle la diminution observée de microARNs localisés dans le locus 14q42, à savoir miR-376a et miR-377, expliquerait la surexpression de Syk et le mauvais pronostic qui lui est associé. Que ce soit dans les cellules du FL ou du MCL, l'inhibition de Syk par le piceatannol est toxique pour celles qui expriment une forme constitutivement active de Syk [124].

## 1.4. Dérégulation fonctionnelle de Syk indépendante du BCR

### 1.4.1. Dans les cellules hématopoïétiques

Dans certaines hémopathies, la transformation cellulaire associées à la surexpression de Syk ou son activation constitutive ne passent pas forcément par une signalisation pro-survie du BCR. Par exemple, dans la leucémie lymphoïde aiguë à cellules B (LAL), la majorité des cellules B primaires isolées de patients présentent une dérégulation de l'expression et du niveau de phosphorylation de Syk. Cependant, ces cellules LAL proviennent en majorité de cellules tumorales dont les précurseurs sont des cellules pro-B dépourvues de pré-BCR et de BCR. De plus, celles qui expriment un BCR présentent une signalisation altérée de ce récepteur qui est due à des lésions génétiques qui s'expriment sous la forme de molécules tronquées qui participent à la formation du signalosome, tels que BLNK ou BTK. Leur limitation de la transduction du signal initié par Syk en amont contribuerait à la leucémogénèse. Leur survie et leur développement suite à un échappement à une sélection négative au stade précoce de la maladie

est interrompu *in-vitro* ou en cas de xénogreffe lorsque Syk est inhibé. De plus, la co-expression de Syk et de ZAP-70 qui concerne la plupart de ces cellules tumorales contribue à leur survie en favorisant l'axe PI3K-AKT plutôt que celui du BCR comme dans la LLC (Figure 15) [124] [95].

En cas d'infection par le virus Epstein-Barr (EBV), l'activité de Syk peut conduire à une hémopathie qui ne dépend pas du BCR. En effet, pendant le stade latent de l'infection, le virus produit dans la cellule une protéine membranaire (LMP2A) [184] qui possède dans sa partie N-terminale un motif ITAM qui est capable d'interagir avec les kinases Lyn et Syk. La phosphorylation de ce motif présent dans la protéine LMP2A permet le recrutement de Syk grâce à ses domaines SH2. Ce recrutement inhibe la signalisation du BCR et la lyse de la cellule B hôte. Par sa capacité à simuler le BCR, LMP2A génère un signal tonique suffisant pour provoquer la prolifération des cellules B qui l'expriment dans les organes lymphoïdes secondaires, y compris dans un modèle de souris déficientes pour la protéine recombinante RAG1. Chez l'adulte immunodéprimé, l'absence de prise en charge de l'infection par les cellules T cytotoxiques peut aboutir à un syndrome lymphoprolifératif post-greffe (PTLD) EBV+. Il en résulte des lymphomes à cellules B caractérisés par une expression de Syk en apparence constitutivement activée. L'expression de LMP2A assure leur survie dépendante de Syk par l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que BCL-XL (BCL2L1) qui résulte d'une activation constitutive de la voie PI3K-AKT. Dans le lymphome de Burkitt par exemple, les cellules B EBV+ sont protégées de l'apoptose induite par Myc. Cette survie dépendante de l'expression et de l'activité de Syk les rend sensibles aux siRNA dirigés contre le transcrite de Syk et aux inhibiteurs de Syk tels que le R406 qui induisent l'apoptose des cellules [185] [139].

La LAM résulte d'une prolifération accrue et d'un défaut de différenciation des progéniteurs myéloïdes qui n'expriment pas le BCR. Un criblage génomique basé sur une stratégie d'ARN interférence, associée à des inhibiteurs de l'EGFR comme inducteur de la LAM, a identifié Syk comme un promoteur de cette pathologie. L'inhibition de Syk avec des drogues ou des siARN induisent non seulement la différenciation des cellules primaires et de lignées cellulaires de LAM, mais également atténuent la croissance tumorale dans la souris [140]. A l'inverse, l'augmentation de l'activité de Syk par les intégrines situées en amont, contribue à la croissance tumorale. Le criblage des gènes essentiels à une lignée de LAM (MLL-AF9) a permis d'identifier l'intégrine- $\beta$  3 (Itgb3) comme un acteur majeur du développement des cellules leucémiques murines *in-vivo* ou des cellules humaines dans un modèle d'étude de

xénogreffe. Dans ces modèles, la phosphorylation de Syk est un médiateur de l'activité d'Itgb3, dont l'inhibition par shRNA ou knockout induit des effets similaires à ceux obtenus lors de l'inhibition de Syk qui conduit à une diminution de sa phosphorylation [141]. Dans les cellules de LAM, le rôle de Syk par son interaction avec les intégrines est corroboré à ceux d'une étude de spectrométrie de masse qui montrent Mac-2 ( $\beta 2\alpha M$  intégrin) et le Fc $\gamma$ RI comme principaux partenaires identifiés de Syk. En réponse à une stimulation, l'un comme l'autre entraîne une activation de Syk qui est abolie lors de la déplétion du CD18 ( $\beta 2$ -intégrin) ou de la chaîne du Fc $\gamma$  des cellules. Comme évoqué plus haut, Syk joue un rôle crucial dans la fonction de diverses cellules par l'intermédiaire des ITAM des FcR avec lesquels la kinase interagit pour transmettre le signal. L'activation constitutive des FcR a été rapportée dans les cellules de LAM, suggérant une signalisation tonique médiée par Syk. De plus, un tiers des patients atteints de LAM est porteur de mutations du gène FLT3, dont l'activité implique une coopération avec Syk. En effet, lorsque FLT3 est activé par phosphorylation, ce dernier se lie à Syk *via* son domaine SH2 en C-ter, permettant ainsi l'amplification de son activité par phosphorylation. Cette boucle d'activation coopérative favorise l'activation de MYC et de ses gènes cibles [142] [186].

## 1.4.2. Dans les cellules non hématopoïétiques

### 1.4.2.1. Rôle de Syk *via* les récepteurs à motifs ITAM

Les cellules non hématopoïétiques peuvent être sujettes à une expression aberrante de molécules à motifs ITAM. Ces dernières conduisent à une activation constitutive de Syk dans les cellules qui l'expriment et causent leur transformation en cellules tumorales. Un exemple concerne les cellules épithéliales mammaires qui entament un processus de transformation et de changement morphologique suite à l'expression de la protéine *env*. Cette dernière est exprimée par le virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) causant des adénocarcinomes chez la souris. Elle contient un motif ITAM sur lequel s'associe les domaines SH2 de Syk pour transduire des signaux qui mènent à la transformation cellulaire, soulignant le rôle oncogénique de Syk. Ces signaux peuvent être interrompu en inhibant Syk par du piceatannol [187].

Comme décrit ci-dessus, LMP2A fonctionne dans les lymphomes EBV+ en « exploitant » l'activité kinase de Syk pour induire des signaux de survie dans les cellules B. Dans le carcinome nasopharyngien, LMPA2 aurait un rôle sur les propriétés physiques des

cellules tumorales, en particulier sur leur motilité. Son expression aberrante s'étend aux kératinocytes, dans lesquels elle promeut de manière Syk-dépendante la migration cellulaire en induisant la translocation de l'intégrine- $\alpha$ V à la membrane [124] [188]. Dans les cellules épithéliales mammaires, la protéine C35 qui contient un motif ITAM est dérégulée. De manière Syk-dépendante, son expression conduit à une prolifération invasive des cellules et une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) marquée par la perte de la cadhérine E [189]. Qu'il s'agisse des protéines *Env*, *LMP2A* ou *C35*, c'est leur expression qui confère un rôle oncogénique à Syk qui est exprimé de manière endogène en conditions normales dans les différents types cellulaires évoqués. Cela suggère que la présence ectopique de ces molécules à motifs ITAM détourne Syk des voies classiques dans lesquelles elle est impliquée et l'insèrent dans des voies de signalisation qui mènent à la transformation cellulaire.

#### 1.4.2.2. Rôle de Syk indépendant des récepteurs

Un biomarqueur des pathologies cancéreuses est la protéine G monomérique K-Ras. Sa mutation oncogénique est fréquente dans les adénocarcinomes pancréatiques, pulmonaires et du colon. Dans ces pathologies, le gène Syk est positivement et majoritairement régulé dans les cellules tumorales qui expriment K-Ras à des taux relativement élevés. La déplétion ou l'inhibition de Syk dans ces cellules conduit à l'activation de la voie de la caspase 3 qui mène les cellules à l'apoptose. Etant donné que dans la plupart des cas, l'expression d'oncogènes tels que K-Ras induit la mort cellulaire à moins d'être protégée par l'expression de molécules anti-apoptotiques, l'expression de Syk pourrait jouer ce rôle en raison de ses fonctions pro-survies [146] [124].

De la même façon, le séquençage complet du génome de cellules issues du rétinoblastome ne montre aucune mutation de gènes codant pour des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur sauf une perte bi-allélique de *RBI*. Elle est associée à une dérégulation de voies épigénétiques qui aboutissent à une faible méthylation du promoteur du gène Syk. Cette déméthylation se traduit par une régulation positive de l'expression du gène et de la protéine Syk dans les cellules primaires et lignées issues du rétinoblastome. Son ciblage par des inhibiteurs induit la mort des cellules tumorales consécutive à une dégradation de MCL-1 qui un facteur pro-survie stabilisé par Syk [148]. Ainsi, tout comme Syk pourrait compenser le rôle pro-apoptotique de K-Ras dans les adénocarcinomes positifs pour cette protéine mutée, il

pourrait, dans le rétinoblastome compenser le rôle antitumorale de *RBI* en activant des voies de survies.

Le rôle oncogénique de Syk dans plusieurs types cellulaires, autres que les cellules hématopoïétiques, est fortement suggéré par l'augmentation de l'ARNm de Syk observée dans plusieurs cas de cancers affectant de nombreux tissus tels que le cerveau, les reins, le colon ou les ovaires. Dans ce dernier, le niveau d'expression de Syk est corrélé au stade de la pathologie. Plus l'agressivité du cancer augmente et plus le niveau d'expression de Syk est fort, avec un niveau maximal dans les cellules au stade 3 qui est le plus agressif. Dans le cancer de poumon à petites cellules (SCLC), Syk a été identifié comme un potentiel oncogène après analyse génomique. Dans 11 cas sur 33 tissus de SCLC analysés issus d'échantillons primaires, l'expression de Syk est plus élevée que celle retrouvée dans l'épithélium alvéolaire normal. De plus, la majorité des lignées de SCLC surexpriment l'ARNm de Syk, dont la déplétion avec un siRNA induit une diminution de la survie des cellules qui le surexpriment. Syk augmente la migration cellulaire dans le carcinome à cellules squameuses de la tête ou du cou où il est fortement exprimé. Cette surexpression est associée à une augmentation des métastases et un mauvais pronostic vital pour les patients [124].

## 2. Syk : Les protéines de fusion

Un réarrangement de gènes peut causer la formation de protéines constitutivement actives ou de protéines à effet dominant négatif par la formation chimérique de protéines de fusion [190]. Parmi les désordres génétiques impliquant Syk dans la tumorigenèse, la translocation chromosomique impliquant son gène est l'une des plus décrites. En effet, elle conduit à la production de protéines de fusion ayant des effets pro-tumoraux, notamment dans les pathologies myéloïdes et lymphoïdes. La protéine de fusion TEL-Syk participe à la transformation des cellules hématopoïétiques. Cette protéine est issue de la fusion entre les exons 1-5 du gène TEL, codant pour son domaine PNT (d'oligomérisation) et la partie C-terminale de son domaine SH2, et des exons codant le domaine kinase de Syk. Le domaine PNT mime le mécanisme d'activation de Syk lorsqu'elle se lie aux récepteurs. Il en résulte une protéine constitutivement activée à haut potentiel oncogénique [191]. L'expression de cette protéine dans les cellules de LMA entraîne l'activation de STAT5 *in vitro* avec une expansion des cellules *in vivo*. Le ciblage STAT5 *in vivo* abolit complètement la myélofibrose induite par

TEL-Syk dans la LAM démontrant le rôle STAT5 comme cible privilégié de TEL-Syk dans la transformation cellulaire [192].

Syk peut également fusionner avec la protéine ITK à la suite d'une translocation entre les gènes des deux kinases. La protéine chimère est constituée de la région N-terminale contenant les domaines Tec et PH d'ITK et l'IDB et le domaine catalytique de Syk. Il en résulte une protéine constitutivement activée dont l'expression est retrouvée chez 17% des patients atteints de lymphomes T périphériques (PTCLs). Ces derniers regroupent un ensemble de lymphomes non-Hodgkiniens très agressifs avec un pronostic vital défavorable. A la différence de TEL-Syk, ITK-Syk a pour cible STAT3 dans les cellules T avec une forte induction de l'expression du CD69 qui est un marqueur d'activation des cellules T [190].

### 3. Syk : les mutations activatrices

Comme décrit ci-dessus, Syk est une protéine régulatrice essentielle à la transduction du signal du BCR. Une augmentation de la signalisation du BCR et des cellules B auto-réactives a été impliquée dans la pathogénèse de maladies auto-immunes, de leucémies B et de lymphomes. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation maligne des cellules B ont beaucoup été étudiés dans les modèles murins et une étude récente a démontré l'importance du rôle pathophysiologique de Syk dans l'immunité innée et adaptative chez l'homme [193].

Le gène Syk est rarement muté dans les cancers comme l'indiquent les données de séquençage [124]. Des polymorphismes nucléotidiques (SNP) de Syk ont été détectés dans les cellules B de la LLC, mais aucun d'entre eux n'entraîne de changements d'acides aminés ni n'affecte son activité kinase [194] [195]. En revanche, des mutations mono-alléliques avec gain de fonction de Syk ont été retrouvées chez des patients qui souffrent d'infections récurrentes, d'inflammation de la peau, des articulations, des intestins et du système nerveux central et ont plus de risques de développer des DLBCL [193] (Tableau 2). L'activation constitutive de Syk conduit à des effets, apparemment paradoxaux, d'immunodéficience et de réponses hyper-

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des variants monoalléliques de Syk retrouvés chez les patients avec leurs caractéristiques cliniques** (selon [193]).

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
	S550Y	S550F	S550F	P342T	M450I	A353T



Âge au moment du diagnostic	2 semaines	2 semaines	2 semaines	12 ans	34 ans	44 ans
Inflammation intestinale	+	+	+	+	+	+
Inflammation de la peau	+	+	+	+	+	-
Inflammation des articulations	+	+	+	-	-	+
Inflammation des poumons	-	+	-	-	+	+
Inflammation du système nerveux central	-	-	-	+	+	-
Inflammation du foie	-	-	-	-	-	+
Infections récurrentes	+	+	+	+	+	+
Hypo-gammaglobulinémie	+	+	+	+	+	+
DLBCL	-	-	-	-	+	+

inflammatoires [123].

Parmi les 6 patients, 3 d'entre eux portent une mutation de Syk qui change le résidu sérine en position 550 en un résidu tyrosine (S550Y) ou en un résidu phénylalanine (S550F). Ce résidu sérine est situé à proximité de la boucle d'activation de Syk (YY525/526) mais à distance de la poche de liaison à l'ATP. Les trois autres patients portent des mutations sur des résidus conservés de Syk, à savoir les résidus méthionine en position 450 (muté en isoleucine), qui est proche de la poche de liaison de l'ATP, proline en position 342 (muté en thréonine) et alanine en position 353 (muté en thréonine). Localisés dans l'interdomaine B (IDB), ces résidus maintiennent Syk dans un état conformationnel auto-inhibé. Une mesure de la phosphorylation des 6 variants de Syk montre une phosphorylation basale élevée sur les résidus tyrosine de la boucle d'activation (Y525/526), suggérant une activation constitutive de tous ces variants de Syk, cohérente avec un gain de fonction.

Les études fonctionnelles de ces variants montrent que leur expression se traduit par une amplification à des degrés différents des signaux des récepteurs immuns passant par phospho-JNK et p-ERK. Chez les patients sont observées une défaillance du système immunitaire et des inflammations à des degrés variables aux niveaux intestinal, cutané, articulaire, hépatique et

nerveuse ainsi que des prédispositions aux lymphomes. Pour mettre à jour le rôle du variant S550Y de Syk chez l'homme, un modèle murin avec une mutation équivalente (S544Y) de Syk a été généré. Comme chez le patient atteint, les souris développent une arthrite érosive sévère. Ces animaux présentent également une défaillance de développement osseux, corroborant ainsi une étude récente montrant le rôle de Syk dans la capacité de résorption de l'os et de la masse osseuse chez la souris (voir rôle Syk dans les ostéoclastes) [122]. Le rôle de ce mutant dans l'inflammation intestinale reste à être établi puisque son expression seule n'est pas suffisante pour provoquer spontanément des inflammations intestinales. En revanche, l'expression de ce mutant augmente la sensibilité des cellules à une exposition à une dysbiose intestinale et provoque des maladies inflammatoires. Ces dernières sont atténuées par l'utilisation d'inhibiteurs de Syk tels que le fostamatinib.

Comme déjà évoqué, il est rare de trouver des mutants de Syk dans les pathologies lymphoïdes dans lesquelles Syk est décrit pour être hyper-phosphorylée. Cependant, l'expression des variants Ala353Thr and Met450Ile de Syk est présente dans 3% des cas de DLBCL [193]. Chez les patients qui présentent de tels variants, la transplantation allogénique de cellules souches pourrait constituer un traitement adapté. Cependant, elle ne palie pas au fait que ces variants sont exprimés dans d'autres types cellulaires qui ne peuvent être remplacées par la transplantation.

## II. Syk suppresseur de tumeur

Tableau 3 *Liste des pathologies cancéreuses dans lesquelles Syk agit comme suppresseur de tumeur* (selon [124]).

Type de cancer	Observation	Références
<b>Leucémie aigüe lymphoblastique des cellules pro-B (Pro-LAL-B)</b>	Extinction de SYK provoque le cancer	[196].

<b>Cancer du sein</b>	Diminution de SYK est corrélée à l'invasion, les métastases et la progression de la tumeur. Méthylation du promoteur et perte allélique. Ré-expression de SYK inhibe la migration et les métastases. Extinction de SYK induit l'EMT	[197] ; [198] ; [117] ; [199] ; [200] ; [201]
<b>Adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC)</b>	Perte de SYK dans les cellules tumorales faiblement différenciées. Extinction de SYK induit l'EMT.	[199]
<b>Cancer de la vessie</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	[202]
<b>Cancer colorectal</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Ré-expression de SYK réduit la migration et l'invasion.	[203]
<b>Mélanome</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. La réexpression de SYK réduit la migration et l'invasion. La réexpression dans les lignées induit la sénescence.	[204] [205] ; [206].
<b>Cancer gastrique</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Changement dans la localisation nucléaire.	[207] ; [208]
<b>Cancer nasopharyngien</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique.	[209]
<b>Carcinome hépatocellulaire (HCC)</b>	Expression de SYK diminuée, extinction épigénétique. Dégradation via CHK1. La ré-expression de SYK réduit la migration et l'invasion. SYK-S augmente les métastases	[210]
<b>Cancer de l'ovaire</b>	SYK favorise la survie cellulaire alors que SYK-S provoque l'apoptose.	[147]

## 1. Dans les cellules hématopoïétiques

De la même manière que l'expression de Syk est dotée de propriétés pro-tumorales en favorisant la survie des cellules cancéreuses, elle a aussi des vertus anti-tumorales. Dans ce cas, l'expression de Syk est réduite, voire éteinte, lors de la transformation cellulaire. Si Syk est

oncogénique dans une large majorité des lignées hématopoïétiques, son rôle est tout autre dans la Leucémie Lymphoïde Aigüe (LAL) à cellules pro-B de l'enfant CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>. Cette pathologie est l'une des rares où l'absence de Syk conduit à la tumorigénèse. En effet, le transcrit de Syk subit un épissage alternatif anormal qui conduit à la réduction de son expression protéique et donc de son activité. L'analyse par PCR de l'ARNm de Syk dans les cellules LAL, suivie de son clonage, montrent des délétions et/ou insertions nucléotidiques suite à un épissage aberrant. Cet ARNm code pour une protéine qui est tronquée de la totalité ou en partie du domaine catalytique de Syk, donnant ainsi naissance à une protéine dotée d'une activité kinase réduite qui est impliquée dans un arrêt du développement des cellules au stade pro-B [196].

## 2. Dans les cellules non-hématopoïétiques

### 2.1. Dans les cellules épithéliales

#### 2.1.1. Les carcinomes

Les carcinomes sont des cancers d'origine épithéliale dont le rôle de Syk a été difficile à préciser. En effet, les carcinomes différenciés et invasifs n'expriment pas la kinase. Si la déplétion de Syk dans les moins différenciés induit un comportement invasif, la ré-expression de Syk dans les plus invasifs retarde la motilité et inhibe la formation de métastases. Syk adopte donc un rôle de suppresseur de tumeur dans la plupart des cancers issus des cellules épithéliales.

Il existe donc une corrélation inverse entre l'expression de Syk et la progression tumorale [117]. En termes d'ARNm et de protéine, Syk est exprimée dans les cellules épithéliales normales des glandes mammaires, ainsi que dans les cellules du sein au premier stade de la cancérogénèse. A l'inverse, Syk n'est pas détectée dans les lignées cellulaires malignes très invasives [117]. Dans les échantillons de patientes, la perte de Syk au cours du développement tumoral est progressive, les niveaux de la kinase étant réduits dans le carcinome canalaire in situ (DCIS) et perdus dans le cancer du sein invasif [197] [198]. La présence des métastases est plus fréquente chez les patientes atteintes d'un cancer du sein dont le niveau du transcrit de Syk est bas. De plus, l'hyper-méthylation des îlots CpG situés dans le promoteur du gène SYK dans les tumeurs mammaires, ainsi que la perte allélique de ce gène, renforcent le lien entre le caractère invasif des cellules et la perte de l'expression de Syk. Généralement, cette hyper-méthylation ne concerne pas les tissus adjacents à la tumeur. La perte mono-allélique de Syk est fréquemment retrouvée dans le carcinome canalaire invasif (IDC) et dans

le DCIS situé à proximité de l'IDC. Par conséquent, les souris haplo-insuffisantes pour Syk présentent un risque accru de tumeurs mammaires [124].

Cette expression différentielle de Syk est retrouvée dans les tumeurs du pancréas. Si Syk est exprimée dans les conduits pancréatiques sains et les canaux tumoraux bien différenciés, elle ne l'est plus dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) dans lequel les cellules passent d'un stade modérément différencié et modestement invasif à un stade faiblement différencié [199]. De façon similaire, Syk est détectée dans les lignées cellulaires de PDAC différenciées alors que cette détection est perdue dans les cellules moins différenciées. Il est intéressant de noter que les cellules cancéreuses du pancréas et du poumon dont la survie dépend de K-Ras ont des caractéristiques de cellules épithéliales, tandis que les cellules tumorales qui ne sont pas dépendantes de K-Ras et dont l'expression de Syk est absente ont des caractéristiques de cellules mésenchymateuses [146].

L'expression de Syk est également régulée négativement dans les cancers de la vessie, du colon et rectum, de l'estomac, du tractus nasopharyngien, dans le mélanome et le carcinome hépatocellulaire (HCC). La diminution de Syk, qui résulte d'une inhibition épigénétique, est observée notamment dans les cellules tumorales les plus agressives et invasives [124]. Dans le HCC, le niveau protéique de Syk est contrôlé par la phosphorylation sur son résidu sérine en position 295 par la sérine/thréonine kinase Checkpoint kinase 1 (CHK1) dont l'expression est aussi dérégulée. Cette phosphorylation promeut l'ubiquitination de Syk qui est ensuite acheminée vers le protéasome pour y être dégradée [211].

Généralement, les sites tumoraux primaires des carcinomes ont une morphologie épithéliale, avec une forte densité cellulaire et une expression de la cadhérine-E localisée au niveau des jonctions cellulaires. Au cours du processus métastatique, les cellules tumorales se séparent de la tumeur primaire pour entrer dans la circulation. Ces cellules entrent dans un processus de transition mésenchymateuse qui est caractérisé par la perte de leur polarité, l'augmentation de leur motilité et de leurs propriétés invasives [212]. Appelé Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT), ce processus est physiologiquement utilisé par les cellules au cours de l'embryogenèse ou du développement des organes. Dans les conditions pathologiques, les cellules tumorales le déclenche dans l'initiation de la formation des métastases et les mécanismes d'invasions. L'activité de Syk dans l'EMT et dans le changement des propriétés des cellules tumorales, dépend directement de son expression différentielle au cours des stades de différenciation des cellules tumorales.

Dans une lignée non transformée du cancer du sein (MCF10A), la déplétion de Syk par shRNA augmente leur motilité, leur capacité invasive et leur croissance et provoque la transition de leurs propriétés de cellules épithéliales à cellules mésenchymateuses [200]. Une analyse génomique confirme cette transition par la perte de l'expression des gènes épithéliaux et le gain des gènes mésenchymateux. Dans la lignée MCF7, qui est une lignée dotée de certaines caractéristiques d'un épithélium mammaire différencié, l'expression d'un variant de Syk dépourvu d'activité catalytique, qui agit comme un dominant négatif, provoque des phénotypes tumoraux dans un modèle de xéno greffe de souris [117]. Des résultats équivalents ont été obtenus dans des cellules d'un carcinome pancréatique dépendant de K-Ras, dans lesquelles l'expression de Syk est abolie par knockout. Ces cellules présentent une perte de l'expression de la cadhérine-E et des propriétés de l'EMT [146]. Il faut noter que le gène Syk fait partie des gènes régulés négativement au cours de l'EMT lorsqu'il est induit dans des cellules du cancer du sein. Dans ce modèle, Syk agit comme un régulateur négatif de l'EMT par le rapport inverse existant entre son expression et la progression tumorale [213].

La faculté de Syk à favoriser et soutenir les propriétés de croissance des cellules ayant un profil épithélial est vraisemblablement à l'origine de ses effets inhibiteurs sur la croissance lorsqu'elle est ré-exprimée dans des cellules mésenchymateuses plus malignes et invasives qui sont dépourvues en Syk. Dans le carcinome mammaire doté de caractéristiques très invasives, la réintroduction de Syk met un frein à diverses fonctions des cellules tumorales telles que leur motilité, leur croissance invasive ainsi qu'à leur capacité à former des métastases dans les modèles xéno greffes de souris [117] [214].

Les mêmes effets sont retrouvés dans le carcinome hépatocellulaire, le cancer colorectal, le mélanome et l'adénocarcinome pancréatique lorsque l'expression de Syk est réintroduite [124]. Dans les cellules Panc1, une lignée de carcinome pancréatique, la réexpression de Syk s'accompagne d'un changement d'expression de près de 2000 gènes. Parmi ces derniers, la métalloprotéase matricielle MMP2 est requise à la croissance invasive des Panc1 dont le profil phénotypique se différencie suite à une augmentation des interactions cellules-cellules lorsqu'elles réexpriment Syk. Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour les fonctions de Syk dans le cancer du sein où elle augmente les interactions cellulaires. Ces effets observés sont réversibles lors d'une inhibition de Syk [214] [215]. L'impact de Syk dans la tumorigénèse résulterait de sa capacité à induire la régulation de l'expression de gènes et de protéines impliqués dans le remodelage du cytosquelette comme l' $\alpha$ -tubuline, la cortactine, l' $\alpha$ -

caténine, MAP1B et la  $\beta$ -caténine. Par ailleurs, Syk est retrouvée dans le centrosome des cellules où elle joue un rôle sur de nombreux processus cellulaires, tels que la migration ou la prolifération [124] [216].

La répression de l'expression de Syk n'est pas le seul moyen par laquelle les cellules tumorales assurent leur survie. Tout au long de leur transformation, au cours de laquelle elles acquièrent un phénotype de plus en plus invasif, d'autres effecteurs sont activés pour accroître leur survie. Dans les cellules de certains carcinomes, qui ne dépendent pas de K-Ras, le niveau d'activation d'AKT est élevé malgré l'absence de PTEN [146].

### 2.1.2. Les mélanomes

Comme dans les carcinomes, l'expression de Syk est fortement diminuée, voire indétectable, dans une majorité des mélanomes. En effet, dans la plupart des lignées de mélanomes et dans près d'un tiers des tumeurs, cette diminution résulte d'une réduction de l'expression de son ARNm qui est consécutive à l'hyper-méthylation du promoteur du gène Syk [217] [218]. La ré-expression de Syk dans la plupart de ces lignées réduit fortement leur capacité proliférative *in vitro* et la progression tumorale dans les modèles de xénogreffes murins [205] [206]. Si la ré-introduction de Syk a des effets antagonistes sur la tumorigène, ils ne sont cependant pas attribués à son activité kinase mais plutôt à sa fonction adaptatrice. Par cette dernière, Syk induit les cellules en senescence en agissant sur le cycle cellulaire par la phosphorylation de TP53 qui consécutive à une cascade de signalisation à l'issue de laquelle le suppresseur de tumeur Rb interagit avec les facteurs de transcriptions de la famille E2F. Il en résulte une répression de gènes cibles tels que les cyclines A et B impliquées dans le cycle cellulaire [219].

### 2.2. Epissage alternatif et suppression de tumeur

Comme décrit précédemment, l'épissage alternatif du transcrite de Syk génère deux isoformes, à savoir Syk-L (Syk) et Syk-S (voir Chapitre 1/III/2. Epissage du gène de Syk: les isoformes de Syk). Ces deux isoformes de la kinase ont été décrites pour ne pas avoir le même impact sur la croissance des cellules tumorales. En effet, la co-expression des formes courte (Syk-S) et longue (Syk-L) a été retrouvée dans plusieurs formes de cancer du sein. Dans une lignée cellulaire tumorale mammaire, le gène Syk est activé alors qu'il est réprimé dans les cellules épithéliales normales. Contrairement à Syk-L, l'expression de Syk-S dans les cellules cancéreuses, qui sont hautement agressives, n'a aucun effet sur leur caractère invasif [220].

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), le niveau d'expression de Syk-S est supérieur à celui de Syk-L [221]. Dans ces cellules tumorales, Syk-L est régulée par sa phosphorylation par la protéine CHK1 sur un résidu absent dans Syk-S. Cette modification post-traductionnelle de Syk-L s'accompagne de sa dégradation et résulte d'un déséquilibre entre les deux formes en faveur de Syk-S [220]. La réintroduction de Syk-L dans des cellules HCC qui en sont dépourvues inhibe leur croissance *in vitro* et réduit celle de la tumeur *in vivo*. L'expression de Syk-S étant associée aux cellules métastatiques et aux cellules tumorales faiblement différenciées, fait que Syk-S est considérée comme un biomarqueur de la progression du HCC [221].

Compte tenu de sa relation avec la survie des cellules tumorales, l'épissage alternatif de Syk est considéré comme un facteur important dans le cancer de l'ovaire [149]. Dans ce modèle, l'expression de Syk-L augmente la survie cellulaire alors que l'induction d'un épissage alternatif en faveur de Syk-S induit l'apoptose des cellules. Ces effets fonctionnels différentiels peuvent être expliqués par leur localisation subcellulaire, à savoir nucléaire et cytoplasmique pour Syk-L et strictement cytoplasmique pour Syk-S [149] [221] [220]. La présence nucléaire de Syk-L peut amener à la répression de facteurs de transcription d'oncogènes tels que la cycline D1 ou FRA1 par son interaction avec des histones désacétylases ou le facteur de transcription SP1 [222].



## Objectifs

Le développement et la fonction des cellules B reposent sur la signalisation du BCR. L'un des acteurs clés de cette signalisation est Syk, une protéine multifonctionnelle dont l'activité est régulée par phosphorylation. La phosphorylation séquentielle de sites spécifiques de Syk lui permet d'acquérir ses fonctions kinase et adaptatrice. Ces phosphorylations modifient les contacts intramoléculaires et provoquent des changements conformationnels. Dans le modèle pathologique de LLC, Syk agit comme un promoteur de tumeur par sa surexpression et son activation constitutive. Cependant, le rôle spécifique de la phosphorylation de ses sites sur ses fonctions kinase et adaptatrice dans les voies de signalisation et les réponses biologiques en lien avec la survie des cellules B de LLC ont peu été étudiés.

Selon le modèle actuel de régulation de Syk, ses phosphorylations la font passer d'un état non phosphorylé auto-inhibé et inactif à un état phosphorylé ouvert et actif [223] ; [37]. Des travaux de l'Unité indiquent que la phosphorylation de Syk lui permet d'adopter plus de deux états conformationnels différents, avec des structures intermédiaires [38]. Ces différents états conformationnels pourraient avoir divers impacts fonctionnels dans les cellules B de LLC. En effet, des travaux antérieurs de l'équipe montrent une différence de survie en réponse à une stimulation du BCR entre les cellules des patients dits « non répondeurs » et « répondeurs » ; ces derniers ayant un risque plus élevé de développer une forme progressive de la LLC [224]. Ces travaux montrent également que le niveau d'expression et le taux de phosphorylation de Syk sont plus forts chez les patients « répondeurs », suggérant que Syk puisse contribuer par ses phosphorylations à la progression de la maladie.

Sur la base de ces données, mes travaux de thèse se fondent sur l'hypothèse selon laquelle ils existeraient, en plus des deux états conformationnels fermé et ouvert, des formes conformationnelles intermédiaires de Syk aux fonctions non élucidées. Ces intermédiaires de phosphorylation pourraient être à l'origine des différences de survie cellulaires entre les patients LLC indolents et progressifs. Pour mettre en évidence cette relation entre la phosphorylation, la structure et la fonction de Syk dans les cellules B de LLC, mon objectif de thèse s'est subdivisé en plusieurs axes :

1. Identification des profils de phosphorylation global et spécifique de Syk dans les cellules leucémiques de patients non-répondeurs et répondeurs en termes de survie cellulaire ;
2. Caractérisation de l'impact des mutants de phosphorylation impliqués dans la fonction kinase et adaptatrice de Syk sur les voies de signalisation du BCR ;

3. Détermination de l'impact fonctionnel des mutants de phosphorylation de Syk sur les réponses biologiques des cellules B de LLC.

## Résultats :

### Manuscrit 1 : Functional Impact of phospho-Syk mutants in B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia)

#### *En cours de finalisation*

L'objectif de ce travail consiste à mieux comprendre comment la phosphorylation séquentielle de Syk, qui lui permet d'acquérir ses fonctions kinase et adaptatrice, contribue à la survie différentielle des cellules B de LLC suite à une stimulation du BCR ; survie cellulaire qui est corrélée à la progression de la maladie. Nous avons donc émis l'hypothèse que les changements des niveaux de phosphorylation de Syk, observés dans les cellules des patients indolents et progressifs, étaient liés à des modifications quantitatives et qualitatives des profils de phosphorylation de Syk qui lui confèreraient des impacts fonctionnels différentiels sur des réponses cellulaires impliquées dans la survie cellulaire.

Après consentement éclairé des patients LLC, des échantillons de sang frais et leurs annotations clinico-biologiques ont été obtenus par le laboratoire d'Hématologie Biologique (Pr. F. Cymbalista, Hôpital Avicenne) et l'Unité de Recherche Clinique (URC, Pr. V. Lévy, Hôpital Avicenne). Une mesure de l'activité métabolique en réponse à une stimulation du BCR des cellules B leucémiques d'une cohorte de patients LLC a été réalisée, permettant ainsi d'identifier deux groupes de patients, à savoir les patients répondeurs (R) et non-répondeurs (NR). Cette distinction fonctionnelle a été montrée être corrélée à la progression de la maladie chez les patients [225]; [175]. Cette mesure a été suivie d'une analyse 1D par Western Blot du niveau de phosphorylation globale de Syk des cellules B de chaque groupe de patients LLC et de donneurs sains en réponse à une cinétique de stimulation du BCR. En parallèle, une analyse électrophorétique 2D des « trains de phosphorylation » de Syk dans les cellules B des deux groupes de patients a été effectuée. Des mutants de Syk (Y323F, YY348/352FF, YY525/526FF et YYY629/630/631FFF) ont été générés par mutagenèse dirigée et transfectés dans une lignée de cellules B de LLC (HG3). La surexpression et les niveaux de phosphorylation global et spécifique ont été mesurés par Western blot. L'impact sur les réponses cellulaires a été déterminé par une mesure de l'activité métabolique (MTS) et par un dosage des facteurs solubles sécrétés dans les surnageants de des cellules B surexprimant les mutants (approche [226] MultiPlex). L'impact fonctionnel des mutants de Syk sur les effecteurs des voies calcique et PI3K a été mesuré respectivement par cytométrie en flux (Phosflow) et par Western Blot.

Nos résultats montrent que les profils 1D de Syk phosphorylée sur ses résidus tyrosine diffèrent en termes d'amplitude suite à une stimulation du BCR des cellules B de donneurs sains et de patients NR et R. L'étude des profils 2D de Syk confirment l'existence de plusieurs formes phosphorylées de cette protéine dont les profils sont différents entre les cellules des NR et R et modifiés suite à une stimulation du BCR des cellules B leucémiques. Ces modifications affectent les résidus tyrosine 352 et 323 de Syk qui sont impliqués respectivement dans ses fonctions kinase et adaptatrice. Dans cellules HG3, la surexpression de mutants de Syk pour ces résidus et d'autres (YY348/352FF ; YY525/526FF ; Y323F et YYY629/630/631FFF) montrent que seuls les résidus impliqués dans le processus d'activation de son domaine catalytique (YY348/352FF et YY525/526FF) agissent comme des dominants négatifs de l'activité métabolique alors que seul le mutant impliqué dans sa capacité d'interagir avec un partenaire (YYY629/630/631FFF) joue un rôle de dominant positif sur la capacité de ces cellules à sécréter des facteurs de pro-survie. L'analyse des voies du BCR montre que les mutants de Syk (YY348/352FF ; YY525/526FF) aux effets dominants négatifs sur l'activité métabolique interfèrent avec l'activation de la PLC $\gamma$ 2, un effecteur de la voie calcique. Quant aux mutants de Syk YYY629/630/631FFF et Y323F, ils semblent légèrement augmenter l'activation du CD19 et d'Akt, des effecteurs de la voie PI3K. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les fonctions kinase et adaptatrice de Syk ont des impacts fonctionnels qui varient en fonction de la réponse biologique d'intérêt.

Ce travail en cours de finalisation fait l'objet d'un manuscrit dans lequel je suis premier auteur. Il apporte de nouveaux éléments sur l'importance de la phosphorylation de Syk dans ses fonctions kinase et adaptatrice et leur impact dans les réponses biologiques des cellules de LLC. Il contribue également à argumenter en faveur de l'existence de conformations intermédiaires de Syk qui pourraient être dotées de fonctions différentes et qui pourraient être ciblées dans le traitement de cette hémopathie B.

## **Functional Impact of phospho-Syk mutants in B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia**

**Harouna Rachidi S.<sup>1,2</sup>, Quettier M.<sup>1,2</sup>, Paillassa J.<sup>1,2</sup>, Ducroux M.<sup>1,2</sup>, Jin H.<sup>1,2</sup>, Le Coquil S.<sup>1,2</sup>, Oudar A.<sup>1,2</sup>, Aubard L.<sup>1,2</sup>, Gardano L.<sup>1,2</sup>, Lévy V.<sup>2,3</sup>, Cymbalista F.<sup>1,2,4</sup>, Varin-Blank N.<sup>1,2</sup> and Le Roy C.<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup>Université Sorbonne Paris Nord, LabEX INFLAMEX; UFR SMBH, Bobigny, France

<sup>3</sup>CRC/URC, AP-HP, Avicenne Hospital; Bobigny, France

<sup>4</sup>Service d'hématologie biologique, AP-HP, Avicenne Hospital; Bobigny, France

### **Abstract:**

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) has a variable clinical course, with some patients remaining stable while others experience progression. By stimulating the B Cell Receptor (BCR) in CLL B cells *ex-vivo*, it is possible to distinguish between non-responder (NR) and responder (R) cases based on cell survival. This survival rate correlates with overall patient survival. Differential phosphorylation levels of Syk, a key kinase in BCR signaling, suggest that post-translationally modified Syk contributes to CLL progression. Our studies reveal differences in global and specific phosphorylation kinetics and spot patterns of Syk between CLL B cells in basal and BCR-stimulated conditions, arguing for the dedicated role of Syk-specific sites. Functional analysis of Syk phosphorylation mutants targeting its activation process or its ability to bind partners shows their distinct involvement in metabolic activity, cytokine secretion, and signaling pathways upon BCR activation. Collectively, our findings provide new insights into the potential role of Syk conformation in CLL pathogenesis and offer insights into potential therapeutic targets for the disease.

**Keywords: CLL, B cells, cell survival, cell secretory capacity, BCR, Syk, phosphorylation, mutants**

## 1. Introduction:

The Syk protein, also known as Spleen Tyrosine Kinase, is of great interest in the development of new therapies due to its crucial role in physiology and pathophysiology. Global deletion of *Syk* causes perinatal lethality with a significant block in B cell development at the pro-B to pre-B cell transition in mouse models (1, 2). On the other hand, monoallelic gain-of-function variants in *Syk* lead to immunodeficiency, systemic inflammatory disease, and predisposition to lymphoma in humans (3). *Syk* single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been detected in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) B cells, but none of them result in amino acid exchanges or affect its kinase activity (4, 5). Interestingly, *Syk* is overexpressed (6, 7) and contributes to an antigen response threshold in cell survival that is associated with overall patient survival (7, 8). Our findings demonstrate that BCR stimulation of primary B CLL cells enables the distinction between two categories of patients, those who respond (R) and those who do not respond (NR), in terms of cell survival. The responder cases belong to progressive patients (7). Inhibition of *Syk* by Fostamatinib (R406), Entospletinib, or Cerdulatinib in patients suggests that these inhibitors are mainly active in CLL compared to other B-cell malignancies (8). This suggests that *Syk* activity in CLL is modulated by non-genetic alterations and is an interesting therapeutic target in patients.

The function of *Syk* has been extensively studied in cells of both the innate and adaptive immune systems, particularly upon the aggregation or ligand binding of immune receptors. Following phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ppITAMS) on the cytoplasmic tails of the CD79 heterodimer in B cells, *Syk* is recruited to the double-phosphorylated intracellular portion of the B Cell Receptor (BCR) and undergoes autophosphorylation (9) and phosphorylation by the membrane-bound Src Family Kinase (SFK) (10, 11). As the downstream tyrosine kinase, *Syk* initiates BCR signaling and activates two downstream signaling pathways. Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling through BLNK, Btk, and PLC $\gamma$ 2 (12), and PI3K signaling via CD19 phosphorylation and PIK3AP1 (13), are important pathways in B cells. By setting the threshold for negative selection of autoreactive and premalignant B clones, *Syk* is diverted from the BCR signalosome by Zap70, its homolog in T cells, and redirected to tonic PI3K signaling, thereby promoting B cell survival (14). This suggests phosphorylated *Syk* forms multi-protein complexes that modulate its activity, leading to various immunological and inflammatory outcomes (15).

Phosphorylation initiates multiple signaling pathways and is required for the *Syk* activation and conformational change (16-19). The *Syk* amino acid sequence contains several acceptor

sites that are differentially phosphorylated over time following BCR stimulation (20, 21). Some modified residues, such as Y<sup>131</sup> in Syk's interdomain A, Y<sup>323</sup>, Y<sup>348</sup>, Y<sup>352</sup> in its interdomain B (22-24), Y<sup>525</sup> and Y<sup>526</sup> in its kinase domain loop (24), and Y<sup>629-630</sup> in its C-terminal tail (25, 26), modulate Syk activation and its activity. So far, two models for the full activation of Syk have been proposed (27, 28) although the functional impact of the phosphorylated residues remain elusive because it depends on the cell model or the *in vitro* conditions of the experiments.

Understanding the divergent functions of Syk requires a thorough knowledge of the regulatory circuits that control Syk activity, *via* its phosphorylation. The classification of CLL patients into two groups based on B cell survival advantage reveals that the profiles and amplitude of Syk phosphorylation differ between basal and antigen-stimulated conditions. Thus, we generated mutants of human Syk protein targeting tyrosine residues involved in either its activation state or its ability to bind partners. Functional analyses show that the overexpression of the mutants differentially affects cell survival and cell secretory capacity. Deciphering the downstream signaling in unstimulated and BCR-stimulated CLL B cells reveals their mechanistic signaling contribution. Our data suggest that Syk phosphorylation sites are involved in the selection of downstream effectors and may be a potential indicator of the BCR response in patients' CLL B cells.

## 2. Results

### *2.1. Differential Syk phosphorylation patterns among CLL B cells upon BCR stimulation*

Given that Syk phosphorylation levels are one sequential effector in BCR-mediated CLL B cell survival (7, 29-31), we hypothesized that differential Syk activation state might influence the differential survival observed in CLL B cells between non-responder (NR) and responder (R) cases. By measuring the metabolic activity of the leukemic B cells in response to BCR stimulation for 48 hours in a cohort of CLL patients (n=64), it is possible to distinguish non-responder (NR; n=25) and responder (R; n=39) cases, confirming what we previously showed (7, 29) (Figure S1A). Next, we analyzed the global tyrosine phosphorylation kinetics of Syk in healthy donors and CLL B cells. Both cell types were stimulated (soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM) and global Syk phosphorylation was determined at different time points by immunoblotting with a phospho-tyrosine antibody after Syk immunoprecipitation (Figure 1A). As described previously (21), Syk phosphorylation levels reached a peak at 2 min of stimulation (mean=24.9; n=4) and decreased within 10 minutes of stimulation in normal B cells. Basal levels of phospho-tyrosine Syk were seen in CLL B cells (7) and BCR stimulation allowed a variable and sustained increase in responding cells (R, mean=5.8; n=8). The enhancement was maximal at 2 min and then slightly decreased upon longer stimulation. In contrast, only a weak increase was observed in non-responding cells (NR, mean=1.5; n=8). In parallel, phospho-Syk profiles were further analyzed by 2D gels after Syk immunoprecipitation. The results show that Syk isoelectric-focusing profiles differed between NR and R samples both in unstimulated and stimulated CLL B cells (Figure 1B), indicative of differences in Syk phosphorylation states as shown by the phospho-Y352 and -Y323 patterns (Figure 1C). Taken together, our results suggest that the differential cell survival observed between NR and R is linked to different Syk phosphorylation states in various CLL cells.

### *2.2. Functional effects of Syk phosphorylation mutants in CLL B cells*

To study the functional impact the Syk phosphorylation sites on its activation process or its interaction with positive or negative partners, different mutants of the kinase were generated by substituting tyrosine amino residues with phenylalanine or serine with alanine, followed by their overexpression in the CLL cell line HG3, that express endogenous Syk and its homolog Zap-70 (Figure S1B).



First, expression and phosphorylation levels were confirmed by Western blot using the appropriate antibodies (Figure S1C). Despite the transfection of the same amount of DNA for each mutant, the expression profile is variable, suggesting different regulatory mechanisms or stability of the overexpressed Syk variants in pathological B cells without impact on cell viability (Figure S1D). Immunoblot analysis of the phosphorylation levels of specific tyrosine confirmed the mutations of the phosphorylatable residue using commercially available antibodies (Figure S1C). In unstimulated HG3, wild-type (WT) Syk was phosphorylated on all phosphorylation sites tested, in agreement with the constitutive Syk activation in CLL B cells (8). In contrast, Syk kinase-dead (KD) showed no phosphorylation signals. The Syk Y323F variant was phosphorylated on all tyrosine residues but not on the mutated site, consistent with its role in the adaptor function of Syk (22, 32). Both the Syk YY348/352FF and YY525/526FF mutants were weakly or not at all phosphorylated for the phosphorylated forms of Syk tested, consistent with their involvement in Syk activation process (27, 28). Interestingly, the triple mutant Syk at residues 629/630/631 was more phosphorylated than the wild type at residues Y323, Y348, Y352, and 526/526, despite its lower expression level. Under these basal conditions, the triple mutant also showed increased total protein tyrosine phosphorylation as compared to the wild type. These three tyrosine residues that are involved in the closed conformation of Syk appeared as negative regulators of Syk auto-phosphorylation as well as Syk kinase activity on other cellular proteins (18).

The different Syk mutants were then functionally tested by measuring metabolic activity upon BCR stimulation of HG3 cells for 24 hours (Figure 2A). Overexpression of Syk WT caused a significant increase in metabolic activity as compared to the empty vector, supporting our hypothesis that Syk contributes to the survival of CLL B cells. In contrast, overexpression of Syk KD strongly reduced survival, directly suggesting a predominantly positive role of its kinase function. Out of the 4 Syk mutants selected, only the YY348/352FF and YY525/526FF mutants significantly reduced the metabolic activity of HG3 cells, whereas the Y323F and YYY629/630/631FFF mutants behaved like the WT form. Upon BCR triggering, all overexpressed mutant forms of Syk increased the metabolic activity of the cells, except for the YY525/526FF mutant, which was similar to the mock condition. In light of the dominant negative role played by the YY348/352FF and YY525/526FF mutants, it can be concluded that the phosphorylation sites involved in Syk kinase activity play a role in CLL cell metabolic activity.

To examine the functional impact of the different Syk mutants, the secretory capacity of several soluble factors was quantified in the supernatants of mutant-expressing cells using a multiplex approach. We chose pro-inflammatory (TNF $\alpha$ , IL6, IL8) and immunoregulatory (TGF $\beta$ s) cytokines or chemokines (CCL4) whose secretion is regulated by antigenic stimulation in CLL B cells (33, 34). Our results show that IL8 (Figure 2B), TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  (data not shown) secretion levels are significantly increased by Syk WT overexpression and decreased in the presence of Syk KD as compared to mock-expressing cells. Of the 4 mutants, only the YYY629/630/631FFF Syk mutant was able to significantly increase the secretion of these three cytokines under basal conditions, while the others tended to reduce the secretion. The secretory response to BCR stimulation results in an increase of the IL8 in the presence of the Y323F and YYY629/630/631FFF forms of Syk; levels that were similar to the Syk WT. In light of the dominant positive role played by the YYY629/630/631FFF mutant in basal condition, it can be concluded that the phosphorylation sites involved in Syk binding partners, such as BLNK, play a role in CLL secretory capacity.

Overall, our results highlight the differential role of Syk' phosphosites in CLL cell biological functions.

### ***2.3.Syk mutants are differentially involved in Calcium and PI3K signaling pathways upon BCR activation***

To better understand the impact of Syk mutants on the survival and secretory capacity of CLL B cells, activation of effectors of the Syk/calcium signaling pathway and the Syk/PI3K signaling pathway were performed.

One of the direct effectors of Syk in the calcium pathway is the phospholipase PLC $\gamma$ 2, whose activation is reflected by its phosphorylation at the tyrosine residue Y<sup>759</sup> in leukemic cells. Results from a phosflow approach showed that overexpression of wild-type Syk (Figure S1E) significantly increased PLC $\gamma$ 2 activation (Figure 2C), while overexpression of the KD mutant did not provide such an activation. Syk Y323F and YYY629/630/631FFF mutants showed similar effects to wild-type Syk in increasing PLC $\gamma$ 2 activation, although the triple mutant tended to be higher. In contrast, mutants involved in the Syk activation process (YY348/352FF and YY525/526FF) significantly decreased PLC $\gamma$ 2 phosphorylation compared

to WT, but still higher than KD or endogenous Syk expressing cells. Thus, both kinase and adaptor Syk roles are involved in the phosphorylation of its effectors, including PLC $\gamma$ 2. No BCR-dependent change in PLC $\gamma$ 2 phosphorylation is detected for any of the mutants, suggesting that some upstream limiting effectors are expressed at low level or absent in this signaling pathway.

Upon BCR stimulation, Syk also engages its positive co-receptor CD19 to activate the PI3K/Akt signaling pathway (14). Before checking the relationship between Syk mutation and CD19 signaling, we stimulated HG3 cells with an anti-IgM for different time points to determine the extent of phosphorylation of endogenous Syk (Y352), CD19 at its YXXM (Y531), and Akt at its serine residue 473. Western blot analysis revealed that 5 min of BCR stimulation was the best condition for optimal phosphorylation of the three proteins in HG3 cells (Figure 2D, left panel). The phosphorylated forms of the different proteins were visualized using the same biochemical approach in HG3 cells overexpressing the different forms of Syk and stimulated or not for 5 min. Overexpression of wild-type Syk leads to increased phosphorylation of CD19 and Akt, whereas the Syk KD did not lead to such phosphorylation (Figure 2D, right panel). Overexpression of the YY348/352FF and YY525/526FF mutants, which impaired Syk phosphorylation, also hampered the activation of CD19 and AKT. In contrast, Syk mutants, which liberate the adaptor region of the kinase Y323F and YYY629/630/631FFF showed profiles similar to the WT form, including their phosphorylation at residue Y<sup>352</sup>. Whatever the effect of the Syk mutants on the activation of the effectors of the PI3K pathway upon BCR triggering, the Y323F and YYY629/630/631FFF mutants led to a slight reduction in the phosphorylation of CD19, suggesting that these tyrosine residues contribute positively to the regulation of this pathway.

### 3. Discussion

To specify the functional impact of the phospho-Syk sites in CLL cells, this study examined the kinetics of Syk phosphorylation between CLL and HD primary B cells upon BCR stimulation. We identified distinct phosphorylation profiles of Syk between non-responding and responding CLL samples, confirming the importance of the various functions of the kinase in the signaling capacity of CLL cells. By analyzing the effects of Syk phosphorylation mutants on different signaling pathways emanating from BCR activation in CLL cells including metabolic activity or cytokine and chemokine expression, we highlighted the importance of specific tyrosine residues in Syk. We distinguished a set of residues necessary to acquire the Syk kinase activity from residues involved in the binding to partners for the regulation of cell survival and secretory functions in CLL B cells. Taken together, these findings shed light on the various roles of Syk in the pathogenesis of CLL.

Syk plays a crucial role in several immune signaling pathways and is activated through a complex mechanism that involves phospho-ITAM binding and phosphorylation (16, 18, 21, 35, 36). Although CLL cells express Syk that is constitutively phosphorylated (6, 7, 29, 30, 37, 38), our kinetic studies revealed that BCR triggering can increase phospho-tyrosine Syk levels in both responding and non-responding cells. This increase was maximal at 2 minutes of stimulation but was at least 4 times lower than those observed in HD B cells (Figure 1A). This result shows that the amplitude of response, in terms of global phospho-Syk, is highly variable. The higher phospho-Syk level observed in responding cases compared to non-responding cases supports the current model, in which Syk phosphorylation is both mediated by binding to phospho-ITAM-bearing receptors and by self-activating phosphorylation (21, 28, 36). This is also consistent with the surface IgM levels exhibiting a gradient of expression between HD cells, responder CLL B cells and the lowest expression for NR CLL B cells (39). Elevated levels of phospho-tyrosine Syk may contribute to reach a threshold, leading to CLL cell survival in responding cells consistent with our previous findings (7).

In line with the described multi-phosphorylation sites Syk (21), our two-dimensional analyses of endogenous Syk expressed by CLL B cells reveal distinct phosphorylation trains/patterns that change upon antigenic stimulation (Figure 1B). This indicates that Syk is differentially phosphorylated qualitatively leading to a variable survival advantage in the leukemic cells. Although this biochemical approach does not allow comparison of signal intensity between cases or within the same sample between two conditions, most phosphorylated forms contain tyrosine residues 352 and 323 (Figure 1C), implying that both

sites contribute to the essential functions of Syk in CLL. On one hand, the phosphorylation of Y352, as well as Y348, is involved in the full activation of Syk in two described mechanistic models. In the first mechanism, known as the 'OR gate' mechanism, Syk can be activated by binding to the phosphorylated ITAM motifs of immune receptors or by phosphorylation of Y352 and Y348 of its interdomain B (27). In the second mechanism, Syk is gradually activated upon binding to phosphorylated ITAM motifs and then fully activated by Lyn kinase at residue Y352 and by Syk itself at residue Y348 (28). On the other hand, phosphorylation of Y323 has a dual role in Syk-mediated signaling. *In vitro* it can result from auto-phosphorylation due to a robust kinase activity (28) or from Src-family kinase targeting in activated B cells (10). Then, it inhibits Syk activity by binding to the E3 ubiquitin ligase Cbl, while also it enables Syk to complex with the regulatory subunit of phosphoinositol-3-kinase (PI3K) (35, 40-42). Although these two sites are necessary for the kinase and adaptor functions of Syk, other phosphorylation sites recognized by the Syk antibody but not by both phospho-specific antibodies (Y352 and Y323), are also present (Figure 1C). This suggests that other phosphorylation sites might be involved in the survival of CLL B cells. Tyrosine residues at positions 525 and 526 in the activation loop are crucial for kinase activation (24, 27, 28) following Syk binding to immunoreceptor pITAMs. This binding causes a conformational change in the kinase, releasing the two SH2 tandem domains from the kinase domain and exposing the interdomain B residues (Y352) to Src kinase phosphorylation. This release allows the activation loop in the kinase domain to move, enabling phosphorylation (Y525/Y526) and full activation of Syk (18, 28). Unfortunately, we were unable to detect a distinguishable signal in the Western blot after 2D migration using an antibody directed against the protein phosphorylated at these two residues. Furthermore, the three tyrosine residues (Y629, Y630, and Y631) located in the C-terminal tail region of Syk are rapidly phosphorylated (21). Phosphorylation by either another kinase or by Syk itself disrupts the contact between the C-terminus and the interdomain A, subsequently stabilizing Syk in its active state (18, 43). Additionally, phosphorylated Y630 binds to the SH2 domain of the downstream target BLNK (26). To our knowledge, there is no commercially available antibody for the recognition of these three phosphorylated residues.

To overcome the lack of commercially available antibodies and drugs that target specific Syk phosphorylation sites, we generated Syk mutants (Y323F, YY348/352FF, YY525/526FF, YYY629/630/631FFF) that affect its kinase and/or adaptor functions. We then assessed their impact on several features in CLL cell lines. Our findings indicate that the activation of Syk kinase function is involved in HG3 metabolic activity and further downstream target phosphorylation. Indeed, overexpression of the KD, YY348/352FF and YY525/526FF forms

resulted in their significant decrease compared to WT (Figure 2A). Correspondingly, these mutants exhibit a weaker phospho-Syk profile and global phospho-tyrosine protein pattern (pTyr) compared to the other mutated forms (Figure S1C). In contrast, neither Y323F nor YYY629/630/631FFF made significant changes compared to the WT Syk (Figure 2A). This suggests that both mutants have full kinase activity, as previously described for Y323 (28) or as indicated by the high phospho-Syk and global phospho-tyrosine protein patterns of YYY629/630/631FFF (Figure S1C). Moreover, these results argue for the level of expression of Syk being important for the capacity of response of the cells. HG3 cells that overexpressed Syk mutants exhibited a slight but significant increase in metabolic activity compared to non-overexpressing Syk mutants (Figure 2A), suggesting that the exogenous supply of Syk in HG3 cells makes them more sensitive to antigenic stimulation in terms of metabolic activity. This finding is consistent with the overexpression of a positive effector of the BCR pathway. However, this increase occurs in all conditions where Syk is overexpressed but is independent of the Syk mutants. These results suggest that Syk behaves differently in antigen-independent (cell-autonomous signaling) or antigen-dependent stimulation (44). To clarify this point, it should be interesting to determine whether the phosphorylation profile of Syk and downstream effectors of the BCR pathway might vary upon long-term stimulation.

The interaction between leukemic cells and the tumor microenvironment plays a crucial role in the pathogenicity of CLL. This collaboration creates a chronic inflammatory environment that activates a signaling network within CLL cells, promoting their survival and growth. It also attracts CLL cells and other immune cells enabling cancer cells to evade the immune system and reducing leukemic cell surveillance (34, 45, 46). We then assessed the HG3 cell's ability to secrete soluble factors in the presence of the different Syk mutants that were overexpressed. Out of the 10 cytokines quantified in the cell supernatants of HG3, which were processed for their metabolic activity (Figure 2A), six (IL6, IL8, CCL4, M-CSF, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) were quantified while four (IL4, IL10, IL35 or TGF $\beta$ 1) were not detectable or were at levels close to those in the cell-free medium. This indicates that the HG3 cell line does not have the same secretory capacity compared to primary CLL B cells (33, 34, 45). Among the six factors quantified, secretion of IFN $\gamma$ , IL6 and M-CSF did not significantly change between Syk variants overexpression (data not shown), suggesting that it is probably not involved in their secretion. Interestingly, a similar dichotomy between the various mutants was observed for the secretion of IL8, TNF $\alpha$ , and CCL4 notably upon BCR triggering (Figure 2B and data not shown) with WT, Y323F and YYY629/630/631FFF forms resulting in their upregulation while KD,

YY348/352 and YY526/526 did not. It could be speculated that the effect of the Y323 or triple mutants of Syk was due to a stabilized open conformation (18, 43), which is available for partner interaction, and was confirmed by higher phosphorylation of CD19 and Akt. These findings suggest that the phosphorylation status of Syk may contribute differently to BCR-dependent signals and other metabolic or secretory responses.

To link the functional impact of Syk phosphorylation mutants to their effect on BCR pathway effectors, we measured the activation of the calcium and PI3K pathways. WT Syk allows an increase in PLC $\gamma$ 2 activation, as do the Y323F mutants and the triple mutant. In contrast, only mutants linked to Syk kinase activation (KD, YY348/352FF and YY525/526FF) reduce it compared to the WT Syk in the absence of antigen stimulation. Our findings are consistent with the Syk model proposed by De Castro (36) and Gradler (18). However, none of the mutants respond to short BCR stimulations, which contradicts our metabolic activity and secretory capacity findings. Indeed, exogenous Syk sensitizes HG3 to respond to antigen stimulation (Figures 2A and B). This leads to the hypothesis that HG3 cells express the BLNK effector, whose function is altered. BLNK is a scaffold protein that recruits Syk substrates (48) and its absence results in the failure of Syk-induced phosphorylation of PLC $\gamma$ 2 following BCR engagement (49). Another hypothesis is that BLNK is bound not only by Syk but also by Zap-70. In HG3 cells, our investigation showed the expression of both members of the Syk family (Figure S1B). Interestingly, it has been shown that Syk alone, but not Zap-70, can activate PLC $\gamma$ 2 to initiate the calcium pathway. This results in a dominant negative effect of Zap-70 when both proteins are co-expressed in B cells (14). Therefore, a rewiring of BCR signaling may occur in HG3 cells. The model was confirmed in the CLL cell line by observing increased endogenous levels of CD19 phosphorylation, a positive BCR co-receptor, and Akt, a PI3K effector, upon BCR stimulation (Figure 2D, left). Furthermore, the increased phosphorylation of CD19 and Akt observed upon overexpression of Syk WT was further enhanced by the Syk mutants Y323F and YYY629/630/631 (Figure 2D, right), suggesting that these phosphorylated residues negatively regulate this pathway under basal conditions. BCR engagement results in a decrease in phospho-CD19 for both mutants, similar to the wild-type. However, the triple mutant exhibits a more pronounced decrease. This outcome confirms the negative impact of the phosphorylated sites of Syk in this pathway and supports the reduction of phospho-Akt. It remains to be determined whether the triple mutant, which is in an open conformation and more phosphorylated, facilitates the recruitment of more phosphatases or fewer kinases when CLL cells are stimulated. Targeting the tyrosine residues 629, 630, and 631 is a promising therapeutic

option as it reduces the CD19/PI3K/Akt pathway in response to BCR stimulation; this pathway plays a crucial role in the development of B cell neoplasms and autoimmune diseases (14).

In summary, this study provides important information on the roles of Syk in CLL cells. It suggests the possibility of future research aimed at better understanding and specifically targeting Syk phosphorylation alterations in the treatment of this disease.



#### 4. Materials and Methods:

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

After informed consent, peripheral blood samples were collected from patients fulfilling diagnostic and immunophenotypic criteria for B-CLL at the Service d'Hématologie Biologique, AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France. B cells were isolated by negative selection (Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's instructions. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on a density gradient and further analyzed either fresh or thawed from liquid nitrogen storage in fetal bovine serum (FBS, PAA) 10% DMSO (Sigma). The CLL B-cell line HG-3 was obtained from the DSMZ. CLL cells were cultured fresh or after thawing in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine in a humid atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

##### *Mutant Generation*

The plasmid pCDNA3.1, which cloned the P43405.KSYK\_HUMAN-WT gene, was used as a mutagenesis template. All primers designed to introduce site-directed mutations, including Y323F, YY348/452FF, YY525/526FF and YYY629/630/631FFF, were synthesized and purified by Eurogentech (Germany) (Table 1). The optimal T<sub>m</sub> (melting temperature) for each primer pair was determined by PCR (New England Biolabs; XXX) and mutants were generated using Q5 Hotstart High-Fidelity 2X MasterMix. PCR amplification products were treated with DpnI at 37°C for 1 hour and transformed into DH5- $\alpha$  competent bacteria (NEB). Ampicillin-resistant colonies were verified by Sanger sequencing using the T6 and SP7 promoters.

Syk mutant	Forward / Reverse primers
Y323F	5'-GTGTCATTCAATCCGTtTGAGCCAGAACTTGCA-3' / 5'-TGCAAGTTCTGGCTCAaACGGATTGAATGACAC-3'
YY348352FF	5'-GGTGTtCGAGAGCCCCTtCGCGGACCCCGAGG-3' / 5'-CCGCGaAGGGGCTCTCGaACACCTCTGTGTCC-3'
YY525526FF	5'-GAAAACTtCTtCAAGGCCAGACCC-3' / 5'-CCTTGaAGaAGTTTTTCATCAGCACG-3'
YYY629/630/631FFF	5'-CGCAATTtCTtCTtTGACGTGGTGAAC-3' / 5'-CGTCAaAGaAGaAATTGCGCAGCCGCAG-3'

Table 1: Primers for generation of Syk mutants. For all primers, mutagenized positions are denoted in lower-case.

### ***HG3 transfection***

Ten million HG3 cells were electrotransfected with the different forms of Syk using the V Nucleofactor kit, the U-14 protocol and according to the manufacturer's instructions (Lonza). After 48 hours of incubation at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, the transfected cells were washed and prepared for analysis by Western blot, flow cytometry or MTS assay, while the supernatants were stored at -80°C for cytokine quantification.

### **Immuno-precipitation**

Responding and non-responding purified B cells, stimulated or not with soluble donkey anti-IgM antibody (20 µg/mL; Jackson ImmunoResearch) for the indicated times, were cross-linked with 1 mM DSP (Pierce) for 10 minutes at room temperature and stopped with 15 mM Tris-HCl at pH 7.5 for 15 minutes at 4°C. The cells were then lysed in 1% CHAPS lysis buffer (5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, 100 mM sodium chloride, 2.5 mM EDTA, 10% glycerol) supplemented with protease inhibitors (0.1 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride, 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich)). After the determination of the protein concentration by the BCA method (Pierce), immunoprecipitations were performed using mouse anti-human Syk (clone 4D10) or a corresponding isotypic control antibody (mAb) (BD Pharmingen). After adsorption of the antibody on Protein G-Sepharose, the beads were washed three times with 1% CHAPS buffer, resuspended in Laemmli 2X buffer and then subjected to Western blotting.

### ***Migration on 2D gels***

Beads associated with Syk complexes were resuspended in IsoElectroFocusing (IEF) buffer (Chaps 4%, Triton X-100 0.24%, urea 7 M, thiourea 2 M) supplemented with DTT (10 mM) and ampholytes pH = 3-10 (0.5%). The samples were then incubated in the presence of strips (ReadyStrip IPG, pH 3-10 linear, 11cm; Bio-Rad) for 8 h, after which the proteins were separated according to their isoelectric point using the following program:

<b>Step</b>	<b>Voltage</b>	<b>Increase</b>	<b>Volt/h</b>
1	50	Fast	400
2	200	Fasr	200
3	1000	Linear	1000
4	5000	Linear	6000
5	5000	Fast	5000

6	8000	Fast	8000
7	100	Fast	

At the end of this step, the strips containing the “focalized” proteins were incubated in the Equilibration solution (6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol, 50 mM Tris HCl pH = 7.4) supplemented with DTT (0.5%), followed by iodoacetamide (100 mM) and bromophenol blue. After sealing (25 mM Tris, 19 mM glycine and 3.5 mM SDS in 1% agarose) on a gel (Criterion TGX Any kD; Bio-Rad), the strips were subjected to a new migration in the second dimension to separate the proteins according to their molecular weight.

### ***Western Blotting***

For primary B cells (normal and CLL), total cell lysates and immunoprecipitation products were subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with the indicated antibodies: mouse anti-Syk, mouse anti-phospho-Zap-70 (Y319) / Syk (Y352) (BD Pharmingen), mouse anti-phosphotyrosine (4G10 Platinum; Millipore), rabbit anti-phospho-Syk (Y525/526), rabbit anti-phospho-Syk (Y323), rabbit anti-HSP 90 (Cell Signalling).

For HG-3 transfected cell lines, they were lysed for 30 min using 0.5% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA and 0.5% Nonidet P-40) supplemented with anti-proteases (pepstatin, leupeptin, aprotinin, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and PMSF). After centrifugation at 13000 x g for 15 min at 4°C, the supernatants were collected and the amount of protein was quantified for all conditions (Thermo Scientific). Proteins were denatured in Laemmli 2X buffer (LB 8X: 0.4 M Tris-HCl, 40% glycerol, 8% sodium dodecyl sulfate, 0.4 M DTT, 0.5 M bromophenol blue) and DTT (concentration). Proteins (30 mg) for each condition were separated on an 8% acrylamide SDS-PAGE gel, transferred to membranes (Amersham), stained with Ponceau red and then blocked for at least 1 h with either 5% milk or 5% bovine serum albumin (BSA) solution in TBS-T (0.1% Tween-20). The membranes were then incubated with primary antibodies diluted in TBS-T overnight at 4°C with agitation, washed again and incubated with rabbit or mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:10,000 Bio-Rad) for 45 min. Proteins were detected using peroxidase substrate (Clarity™ or Claritymax™ Western ECL Substrate, BIO-RAD) and chemiluminescence (ChemiDoc MP Imaging System, BIO-RAD).

### ***Phosphoflow assay***

HG-3 overexpressing Syk mutants were labeled extracellularly with anti-CD5/APC-Cy7 (dilution 1/20; BD Bioscience) and anti-CD19/PE-Cy7 (dilution 1/20; BD Bioscience) for 20 min at 4°C in PBS 1X supplemented with 2% FBS. Cells were incubated with Lyse/Fix 1X buffer followed by Perm/Wash 1X buffer (BD Biosciences) with anti-Syk/FITC or isotype (dilution 1/50; BD Biosciences) and anti-PLC $\gamma$ 2 pY<sup>752</sup>/PE (dilution 1/20 BD Biosciences) antibodies in Perm/Wash buffer for 1 hour at 4°C according to the manufacturer's instructions. Data were acquired using the BD FACSCanto II analyser (BD) and analyzed using FlowJo (BD).

### ***MTS assay***

After 24 h of culture in a 6-well plate, transfected HG3 with Syk forms were counted and 200,000 cells were cultured for a further 24 h in 96-well plates, either coated or not for BCR stimulation with rabbit anti-human IgM FC5 $\mu$  AffiniPure (20  $\mu$ g/ml; Jackson ImmunoResearch Laboratories), in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in RPMI-1640 (Lonza). Metabolic activity was determined using the CellTiter 96 AQueous Proliferation Assay according to the manufacturer's instruction (Promega). For primary CLL B cells, the metabolic fold increase (% MTS) was determined using the formula: [(absorbance stimulated t=72h) – (absorbance unstimulated t=72h)] / (absorbance unstimulated t=72h) x 100; MTS values > 25% and < 25% defined the responder and non-responder CLL groups, respectively (Deglesne PA 2006; Le Roy C 2012).

### **Data analysis and statistics**

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. A 2-tailed unpaired Student *t* test was used to compare individual groups (NR vs. R), while a Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare Syk mutant forms. Statistical analyses were performed using GraphPad (GraphPad Software Inc).

## 5. Figure legends:

Figure 1: ***Differences in the extent and duration of Syk phosphorylation between CLL and normal primary B cells upon BCR stimulation.*** **A)** B cells were obtained from healthy donors (HD), non-responding (NR) and responding (R) CLL patients. These cells were incubated for the indicated times (min) in the presence of the soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml). After lysis, 90% of the cell lysates were immunoprecipitated with an anti-Syk antibody (α-Syk IP) and 10% were kept as total cell lysates (Totals). Western blotting was used to analyze the expression levels of global tyrosine-phosphorylated (α-pTyr) and total Syk (α-Syk), with an anti-HSP90 antibody was used as a loading control. The phospho-Syk/Syk ratios were calculated, normalized to time 0, and graphed as the pY-Syk range in HD B cells (n=7) and CLL B cells (NR n=7 and R n=12). **B** and **C)** After 2 min of stimulation with anti-IgM (+) or without (-), Syk was immunoprecipitated from CLL non-responding (NR) and responding (R) B cells. The immunoprecipitated Syk was subjected to a first migration (horizontal arrow pH4 to pH10) and then to a second migration (vertical arrow). Western analysis showed the Syk profile (WB anti-Syk, **B** and **C**) with specific modifications on tyrosine residue 352 (WB: pY<sup>352</sup>Syk) or on tyrosine residue 323 (WB: pY<sup>323</sup>Syk) (**C**). The asterisks positioned on the left side of the blots serve to indicate the heavy chain of the antibody employed in the immunoprecipitation procedure. The vertical line indicates the isoelectric point of Syk. Wilcoxon matched-pairs signed rank test with *p-values* <0.05 (\*) and <0.001 (\*\*).

Figure 2: ***Differential functional effects of Syk phosphorylation mutants and their signaling involvement in CLL B cells.*** The HG3 cell line was transfected with different constructs, including the empty plasmid (Mock) or encoding the Syk variants (wild type (WT), kinase-dead (KD) or 4 tyrosine mutants (Y323F, YY348/352FF, YY525/526FF and YYY629-630FFF). Cells were counted and then stimulated with coated anti-IgM (+) or without (-) for the last 24 h after transfection. **A)** An MTS assay was performed on cells (n=6) and **B)** a multiplex array was performed on cell supernatants to quantify IL8 (n=6). **C)** After 48 h of transfection, HG3 cells were stimulated with soluble anti-IgM (+) or without (-) for 5 min, labeled extracellularly for CD19 and CD5 and then intracellularly for Syk and activated PLCγ2 (Supplementary Figure 1 legend). For each Syk variant overexpressed, pY<sup>759</sup>PLCγ2 median fluorescent intensity (MFI) was collected and expressed relative to pY<sup>759</sup>PLCγ2 in pCDNA. **D left panel)** HG3 cells were incubated for the indicated times (min) in the presence of soluble

F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml). After lysis, Western blotting was used to visualize the expression and activation levels of different effectors, with anti-tubulin antibody used as a loading control. **D right panel**) HG3 cells expressing the Syk variants were stimulated (5) or not (0) with F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml) 48 hours after transfection. Cells were lysed and subjected to western blot with the indicated antibodies; anti-actin was used as a loading control. The Wilcoxon matched-pairs signed rank test indicates the significance between Mock and other conditions in black, between Syk WT and other conditions in orange, and between minus and anti-IgM in red.

Supplementary Figure 1: **Metabolic activity of primary CLL B cells and characteristics of Syk mutants in HG3 cells.** **A)** After 72 hours of BCR stimulation, the fold increase in metabolic activity (% MTS) was determined for 25 non-responding (NR) and 39 responding (R) CLL cells. The Mann-Whitney test shows a p-value of <0.0001 (\*\*\*\*). **B)** Western blot analysis was used to detect endogenous (Mock) and overexpressed (WT) Syk and endogenous Zap70 in HG3 cell line. **C)** Western blot was used to detect Syk, its specific phosphorylated forms and tyrosine phosphorylated proteins in HG3 cells overexpressing Syk mutants. **D)** The percentage of HG3 viability in the presence of Syk mutants was measured. **E)** The expression of endogenous and overexpressed Syk (top) and the activation of PLCγ2 (middle) in viable CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> HG3 cells were examined by phosflow. The intensity of pY<sup>759</sup>PLCγ2 in viable CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> cells overexpressing Syk variants is also shown (bottom).



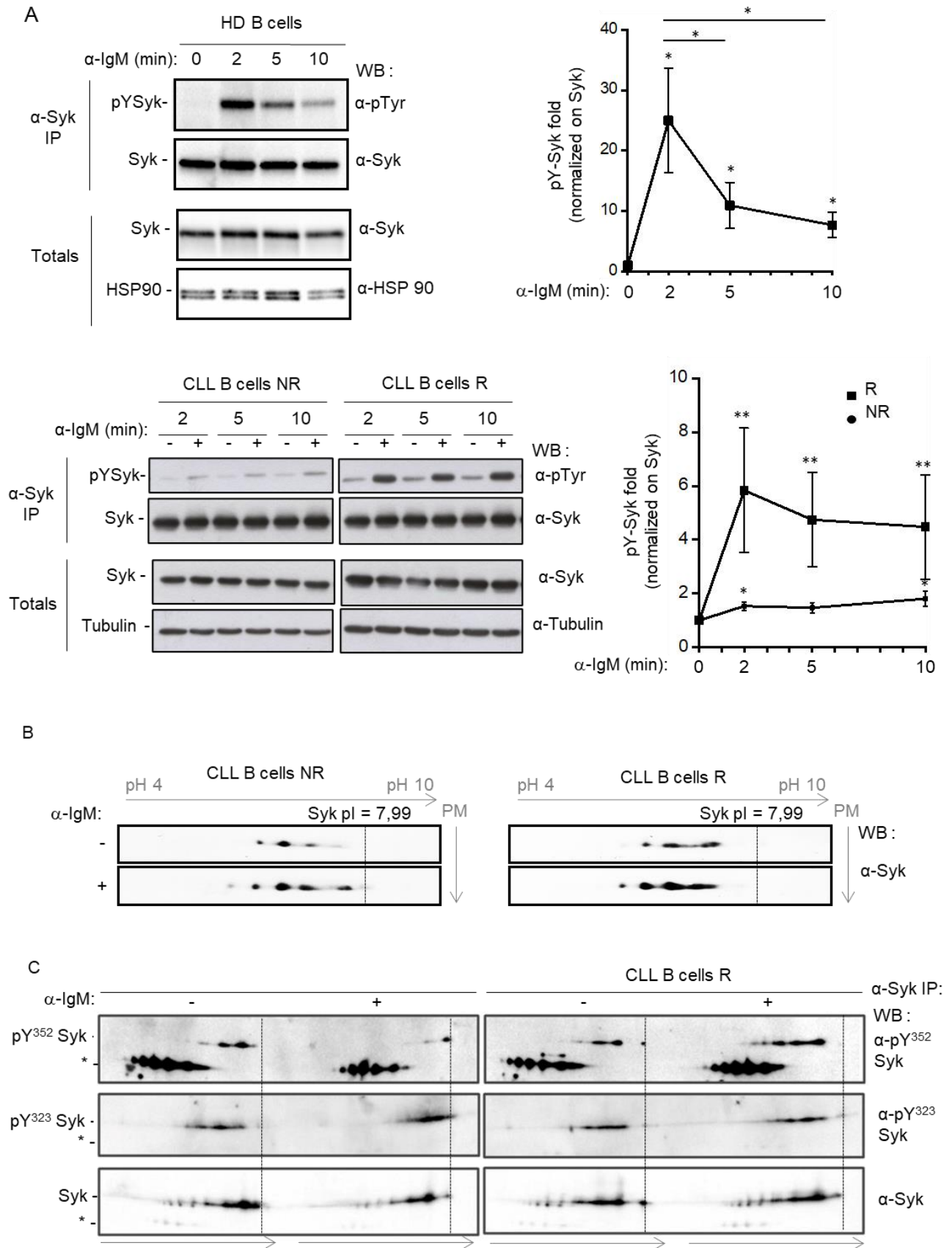


Figure 1



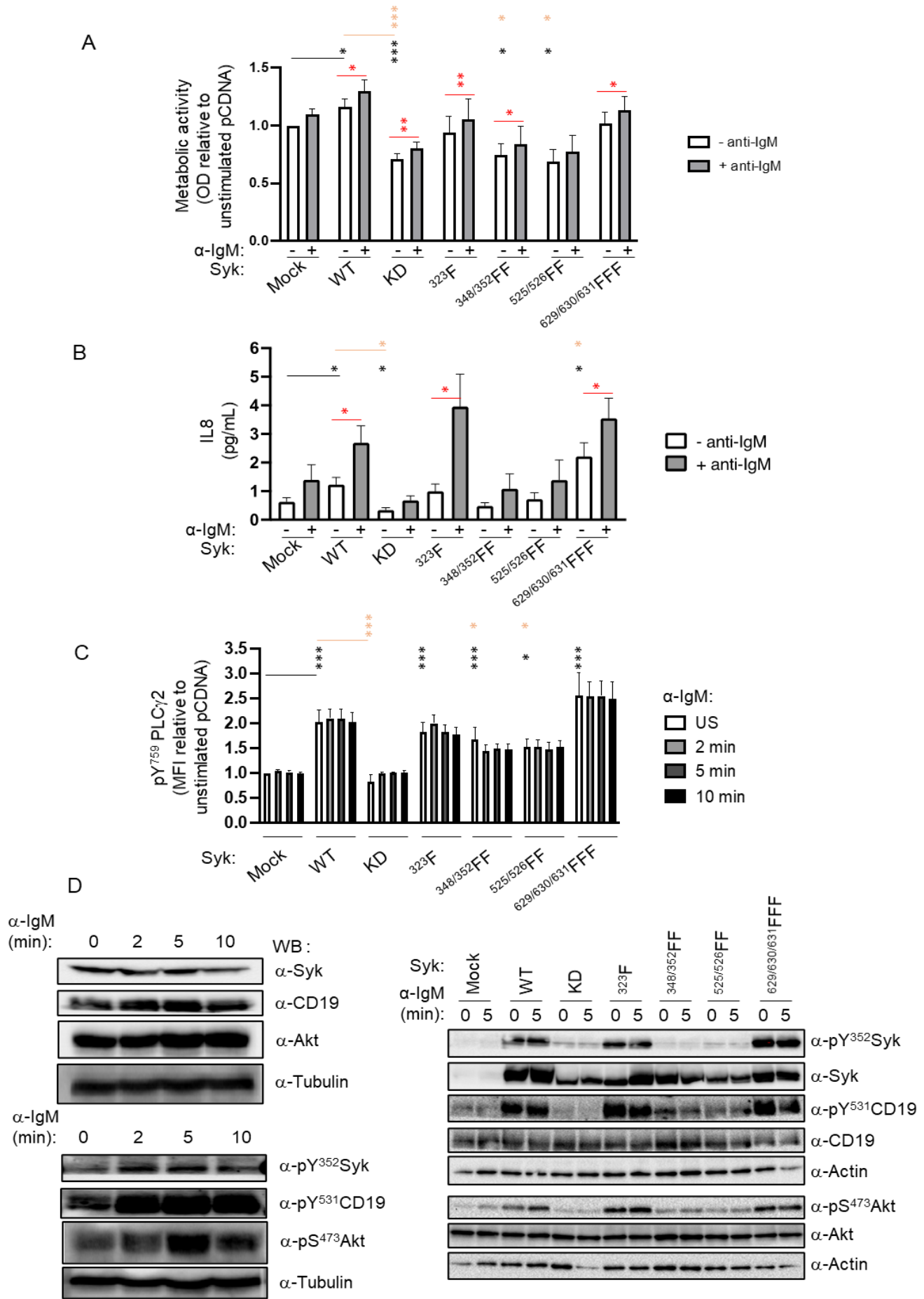
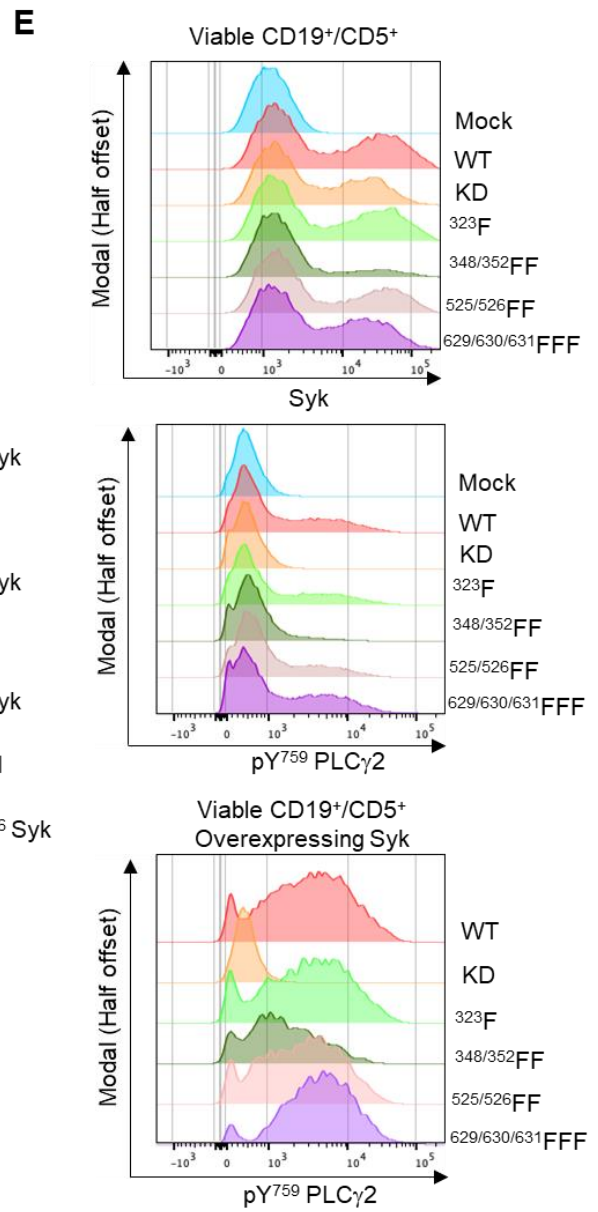
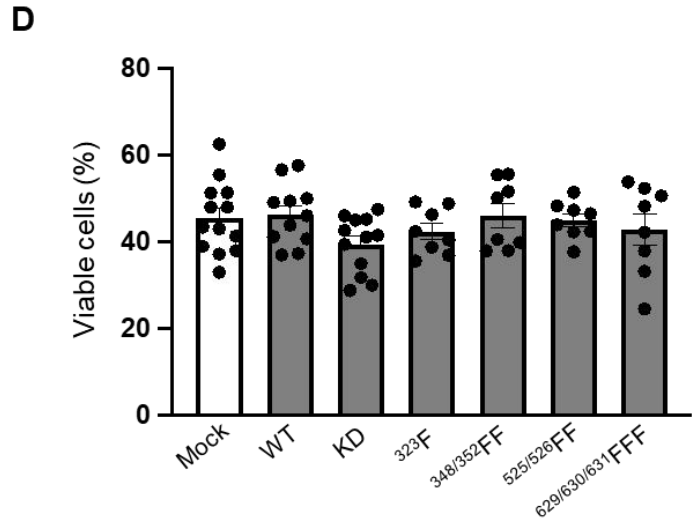
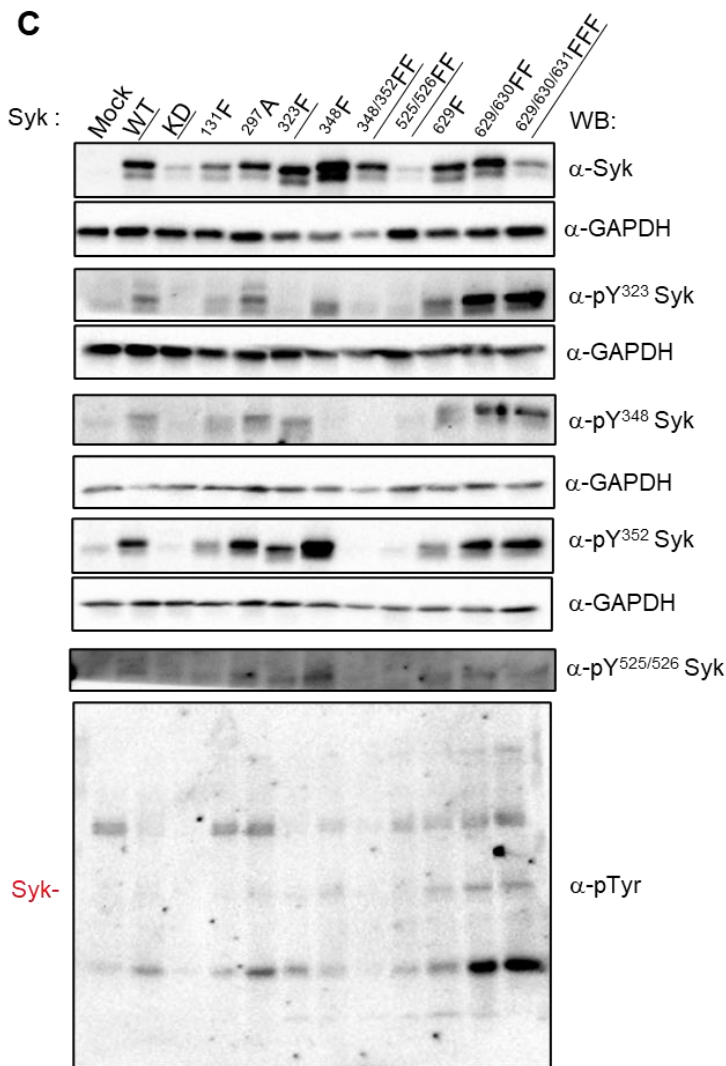
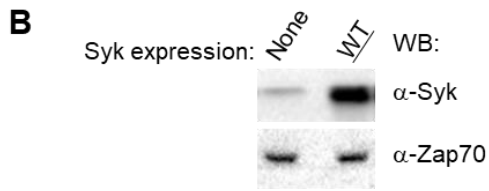
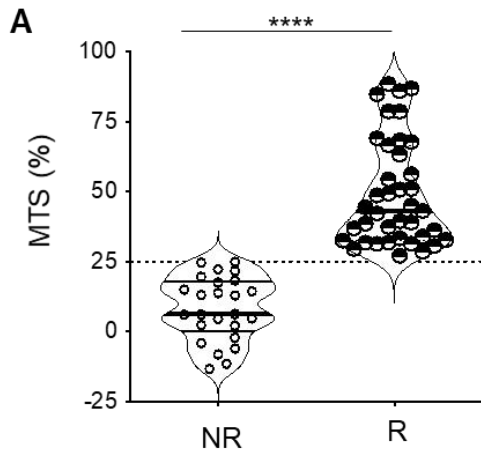


Figure 2



Supplementary Figure S1

## **Acknowledgments**

This study was supported by INSERM and USPN. HRS was the recipient of LabEX Inflammex; MQ of Ligue Nationale Contre le Cancer and PJ of Année Recherche Pays de la Loire. We acknowledge Dr. S. Saint Georges for assistance in CLL sample preparation.

## **Authorship Contributions**

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

Financial supports: **INSERM, USPN, LabEX Inflammex n°ANR11 IDEX00502, Ligue Nationale Contre le Cancer, Année Recherche Pays de Loire.**

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

## References:

1. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*. 1995;378(6554):303-6.
2. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*. 1995;378(6554):298-302.
3. Wang L, Aschenbrenner D, Zeng Z, Cao X, Mayr D, Mehta M, et al. Gain-of-function variants in SYK cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice. *Nat Genet*. 2021;53(4):500-10.
4. Brown JR, Levine RL, Thompson C, Basile G, Gilliland DG, Freedman AS. Systematic genomic screen for tyrosine kinase mutations in CLL. *Leukemia*. 2008;22(10):1966-9.
5. Philippen A, Diener S, Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S, Mertens D. SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol*. 2010;150(5):633-6.
6. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholome K, Burger M, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69(13):5424-32.
7. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(2):356-65.
8. Efremov DG, Turkalj S, Laurenti L. Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6).
9. Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel CL, Harrison ML, Geahlen RL. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1355(2):177-90.
10. Keshvara LM, Isaacson CC, Yankee TM, Sarac R, Harrison ML, Geahlen RL. Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J Immunol*. 1998;161(10):5276-83.
11. Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WW, Zurn C, et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell*. 2002;10(5):1057-69.
12. Baba Y, Hashimoto S, Matsushita M, Watanabe D, Kishimoto T, Kurosaki T, et al. BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2582-6.

13. Okada T, Maeda A, Iwamatsu A, Gotoh K, Kurosaki T. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity*. 2000;13(6):817-27.
14. Sadras T, Martin M, Kume K, Robinson ME, Saravanakumar S, Lenz G, et al. Developmental partitioning of SYK and ZAP70 prevents autoimmunity and cancer. *Mol Cell*. 2021;81(10):2094-111.e9.
15. Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):387-402.
16. Arias-Palomo E, Recuero-Checa MA, Bustelo XR, Llorca O. Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(8):1211-7.
17. Cottat M, Yasukuni R, Homma Y, Lidgi-Guigui N, Varin-Blank N, Lamy de la Chapelle M, et al. Phosphorylation impact on Spleen Tyrosine kinase conformation by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Sci Rep*. 2017;7:39766.
18. Gradler U, Schwarz D, Dresing V, Musil D, Bomke J, Frech M, et al. Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol*. 2013;425(2):309-33.
19. Bond PJ, Faraldo-Gómez JD. Molecular mechanism of selective recruitment of Syk kinases by the membrane antigen-receptor complex. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25872-81.
20. Hutchcroft JE, Harrison ML, Geahlen RL. B lymphocyte activation is accompanied by phosphorylation of a 72-kDa protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1991;266(23):14846-9.
21. Bohnenberger H, Oellerich T, Engelke M, Hsiao HH, Urlaub H, Wienands J. Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(6):1550-62.
22. Rao N, Ghosh AK, Ota S, Zhou P, Reddi AL, Hakezi K, et al. The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J*. 2001;20(24):7085-95.
23. Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35442-7.
24. Zhang J, Kimura T, Siraganian RP. Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *J Immunol*. 1998;161(8):4366-74.
25. Zeitlmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15445-52.

26. Kulathu Y, Hobeika E, Turchinovich G, Reth M. The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *EMBO J.* 2008;27(9):1333-44.
27. Tsang E, Giannetti AM, Shaw D, Dinh M, Tse JK, Gandhi S, et al. Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32650-9.
28. Mansueto MS, Reens A, Rakhilina L, Chi A, Pan BS, Miller JR. A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism. *J Biol Chem.* 2019;294(19):7658-68.
29. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 2006;66(14):7158-66.
30. 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;28(37):3261-73.
31. Carsetti L, Laurenti L, Gobessi S, Longo PG, Leone G, Efremov DG. Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation. *Cell Signal.* 2009;21(7):1187-94.
32. Sohn HW, Gu H, Pierce SK. Cbl-b negatively regulates B cell antigen receptor signaling in mature B cells through ubiquitination of the tyrosine kinase Syk. *J Exp Med.* 2003;197(11):1511-24.
33. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood.* 2009;113(13):3050-8.
34. Mékinian A, Quinquenel A, Belkacem KA, Kanoun F, Dondi E, Franck E, et al. Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression. *Cancer Gene Ther.* 2023;30(7):1018-28.
35. Geahlen RL. Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(7):1115-27.
36. de Castro RO. Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond. *J Signal Transduct.* 2011;507291:1-9.
37. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;105(5):2036-41.

38. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev.* 2007;7(2):102-8.
39. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(2):356-65.
40. Yankee TM, Keshvara LM, Sawasdikosol S, Harrison ML, Geahlen RL. Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J Immunol.* 1999;163(11):5827-35.
41. Hong JJ, Yankee TM, Harrison ML, Geahlen RL. Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31703-14.
42. Moon KD, Post CB, Durden DL, Zhou Q, De P, Harrison ML, et al. Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1543-51.
43. de Castro RO, Zhang J, Jamur MC, Oliver C, Siraganian RP. Tyrosines in the carboxyl terminus regulate Syk kinase activity and function. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26674-84.
44. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature.* 2012;489(7415):309-12.
45. Vom Stein AF, Hallek M, Nguyen PH. Role of the tumor microenvironment in CLL pathogenesis. *Semin Hematol.* 2023.
46. Zaaboub R, Vimeux L, Contremoulins V, Cymbalista F, Lévy V, Donnadieu E, et al. Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Adv.* 2022;6(16):4691-704.
47. Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front Oncol.* 2020;10:1422.
48. Zoller KE, MacNeil IA, Brugge JS. Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol.* 1997;158(4):1650-9.

49. Couture C, Williams S, Gauthier N, Taylor P, Mustelin T. Role of Tyr518 and Tyr519 in the regulation of catalytic activity and substrate phosphorylation by Syk protein-tyrosine kinase. *Eur J Biochem.* 1997;246(2):447-51.



## Manuscrit 2 : Regulatory interplay between Vav1, Syk and $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells.

Dans les cellules hématopoïétiques, les protéines Syk, Vav1 et  $\beta$ -caténine sont exprimées et sont impliquées dans différentes voies de signalisation pour réguler diverses réponses biologiques [227] [228] [229]. La tumorigénèse peut être associée à des dysfonctionnements des voies de signalisation impliquant l'expression ectopique de ces effecteurs, comme c'est le cas dans les cellules du cancer du poumon. Sachant que nos travaux montraient la formation de complexes entre Syk et Vav1 dans les cellules hématopoïétiques et entre Vav1 et  $\beta$ -caténine dans les cellules d'une lignée cancéreuse pulmonaire (H358), nous avons émis l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre ces 3 protéines dans les cellules du cancer du poumon.

Comme dans les cellules hématopoïétiques, nos travaux montrent l'existence d'une interaction entre Syk et Vav1 dans des cellules d'une lignée de carcinome pulmonaire, les H358. La déplétion de Syk ou son inhibition pharmacologique dans ces cellules provoquent la diminution de la phosphorylation globale de Vav1, sans affecter le niveau de phosphorylation de son résidu tyrosine 174, qui est phosphorylée par Syk dans les cellules hématopoïétiques. De plus, Syk, comme Vav1, interagissent avec  $\beta$ -caténine dont la phosphorylation est dépendant de Syk. Le complexe formé entre Syk, Vav1 et  $\beta$ -caténine module la migration et l'invasion cellulaire par l'intermédiaire des GTPases Rac1 et Cdc42, sans affecter la prolifération comme le montrent nos données générées dans les cellules déplétées par Syk ou Vav1. De manière originale, nos travaux ont identifié le gène *SYK*, comme une nouvelle cible transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine dans ces cellules épithéliales. En effet, nous avons mis en évidence l'existence de deux sites de fixation du complexe  $\beta$ -caténine/TCF4 sur la séquence promotrice du gène *SYK*. Ce mécanisme de rétrocontrôle transcriptionnel entre Syk et  $\beta$ -caténine participe à élucider l'importance de la signalisation médiée par Syk, Vav1 et  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses pulmonaires.

Ces travaux ont été publiés dans le journal *Cellular Signaling* dans un article où je suis le quatrième auteur. Ils ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la nature et la régulation de l'interaction entre Syk, Vav1 et  $\beta$ -caténine et sur la fonction de ce trio protéique dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses pulmonaires.

Ma contribution à ce travail effectué en Master 1 a consisté à étudier l'impact de l'expression de Syk et de Vav1 sur la modulation des modifications post-traductionnelles de la

$\beta$ -caténine dans la lignée cellulaire 293T. Pour cela, j'ai surexprimé dans ces cellules la kinase Syk et le facteur d'échange Vav1. Après une immunoprécipitation de Syk et une visualisation de ses partenaires par western blot, mes résultats ont mis en évidence une interaction entre Syk et la  $\beta$ -caténine. De plus, j'ai pu démontrer une synergie entre Syk et Vav1 sur la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur son résidu tyrosine 142 qui est impliqué dans sa translocation nucléaire. Dans ce modèle cellulaire, la surexpression de Syk m'a permis de mettre à jour, en plus de la  $\beta$ -caténine, d'autres cibles potentielles de Syk par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant les protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosine. Mes résultats ont ainsi contribué à renforcer l'hypothèse selon laquelle Syk et Vav1 participent à réguler la localisation et les fonctions de la  $\beta$ -caténine grâce à leur interaction et aux modifications post-traductionnelles qu'elles apportent ; hypothèse qui a été confirmée par des expériences ultérieures effectuées par mes co-auteurs.

Ma contribution a également consisté à l'écriture d'une partie du matériel et méthodes et à la relecture du manuscrit avant sa soumission.

**Regulatory interplay between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells.**

**Boudria Rofia<sup>1,2,3</sup>, Vanessa Laurienté<sup>1,2,3</sup>, Antonin Oudar<sup>1,2</sup>, Souleymane Harouna-Rachidi<sup>1,2</sup>, Elisabetta Dondi<sup>1,2</sup>, Christine Le Roy<sup>1,2</sup>, Laura Gardano<sup>1,2</sup>, Nadine Varin-Blank<sup>1,2,4</sup> and Lionel Guittat<sup>1,2,4</sup>**

1. INSERM, UMR 978, Bobigny, France
2. Labex Inflammex, Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH, Bobigny, France
3. These authors contributed equally.
4. The authors share co-corresponding authorship. UMR U978 Inserm/Université Sorbonne Paris Nord

74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France

Tel: 33(1) 48 38 88 51 Fax: (33) 1 48 38 76 69

E-mail: nadine.varin@inserm.fr and lionel.guittat@univ-paris13.fr

## **Abstract**

Vav1 exhibits two signal transducing properties as an adaptor protein and a regulator of cytoskeleton organization through its Guanine nucleotide Exchange Factor module. Although the expression of Vav1 is restricted to the hematopoietic lineage, its ectopic expression has been unraveled in a number of solid tumors. In this study, we show that in lung cancer cells, as such in hematopoietic cells, Vav1 interacts with the Spleen Tyrosine Kinase, Syk. Likewise, Syk interacts with  $\beta$ -catenin and, together with Vav1, regulates the phosphorylation status of  $\beta$ -catenin. Depletion of Vav1, Syk or  $\beta$ -catenin inhibits Rac1 activity and decreases cell migration suggesting the interplay of the three effectors to a common signaling pathway. This model is further supported by the finding that in turn,  $\beta$ catenin regulates the transcription of Syk gene expression. This study highlights the elaborated connection between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin and the contribution of the trio to cell migration.

**Keywords: Vav1, Syk,  $\beta$ -catenin, regulation, migration**

## 1. Introduction

Elucidation of the biological mechanisms inherent to the physiological cell state that have been corrupted to drive and maintain the oncogenic cell state is crucial to better understand tumorigenesis as well as to develop new therapies [1, 2]. The proto-oncogene, Vav1, has a restricted hematopoietic expression and exhibits both GTP/GDP exchange activities (GEF) for Rho family GTPases and adaptor functions within a number of signaling complexes [3, 4]. The three members of the Vav family interact with membrane receptors, signaling intermediates, cytoskeleton proteins and nuclear factors [5-7]. The initial characterization of Vav1 consisted in a truncated version of the proto-oncogene that resulted in a transforming protein (onco-Vav) when expressed in fibroblasts [8]. Although this oncogenic form has never been described in neoplasms, an ectopic expression of wild-type or mutated forms of Vav1 is detected in neuroblastoma, medulloblastoma, pancreatic adenocarcinoma, melanoma, breast cancer, T-cell leukemia, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [9-17]. Depending on tumor cell type, Vav1 regulates cell-cycle progression, proliferation, transformation, migration and invasion [18, 19]. Thus, Vav proteins display a pivotal role in tumorigenesis although far from being fully characterized. Our initial goal was to better understand the different functions of Vav1 affected when expressed ectopically and those of its key partner in hematopoietic cells: the spleen tyrosine kinase, Syk [20]. As Vav1, Syk is expressed at the highest levels in cells of hematopoietic origin and functions as an essential component of the signaling machinery of multiple receptors in the immune system. In addition, there are multiple reports of Syk expression outside of the immune system, particularly in epithelial cells from a variety of organs [21]. In cancer cells, Syk acts as a tumor promoter or a tumor suppressor depending on the cell of origin [22]. In many hematopoietic malignancies, Syk is responsible for cell survival and its inhibition frequently triggers apoptosis. In several other neoplasms, it can suppress tumorigenesis through regulation of motility and metastasis [22, 23]. Vav1 and Syk independently have been proposed to play a role, in normal and cancers cells, in the regulation of cell plasticity in which functions of  $\beta$ -catenin are crucial [24-26].

$\beta$ -Catenin is a multifunctional protein with a central role in pathophysiology as well as during development and is a core effector of the canonical Wnt pathway [27, 28]. The stabilization of  $\beta$ -catenin is crucial in tumorigenesis and is induced by constitutive Wnt activation or mutations in the  $\beta$ -catenin itself or in the destruction complex proteins regulating its stability [29].  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm depending on destruction complex activation, and subsequently migrates into the nucleus, where it interacts notably with TCF/LEF transcription

factors and induces the transcription of target genes such as Axin2, c-Myc and CyclinD1 [30-32].  $\beta$ -catenin dependent signal transduction depends on its phosphorylation status which is regimented by a balance of kinases and phosphatases. GSK3 $\beta$  phosphorylates constitutively  $\beta$ -catenin on the residues Ser33, Ser37 and Thr41 driving it to destruction by the proteasome in absence of Wnt [33]. Binding of Wnt to its receptor Frizzled impairs the triple phosphorylation of  $\beta$ -catenin leading to its stabilization and accumulation. In spite of the triple phosphorylation, phosphorylation of other residues also enhances  $\beta$ -catenin stability [27]. For example, phosphorylation of S675 and Y654 increases  $\beta$ -catenin stability via the inhibition of its ubiquitination [34, 35]. Thus, targeting  $\beta$ -catenin post-translational modifications could represent a valid strategy to challenge cancers driven by active Wnt/ $\beta$ catenin signaling.

In this study, we show that Vav1 and Syk interact in lung carcinoma cell lines similarly to hematopoietic cells. Moreover, Syk, like Vav1, interacts with  $\beta$ -catenin and both proteins modulate its post-translational modifications. The three partners regulate migration and invasion through mainly Rac1 but also Cdc42 activity in lung carcinoma cells illustrating their contribution to cell plasticity. Moreover, we identify SYK gene as a new  $\beta$ -catenin transcriptional target in epithelial cells. Altogether, these data delineate new lines of research to elucidate the crucial contribution of  $\beta$ -catenin, Syk and Vav1 signaling in cancer cells.

## 2. Results

### 2.1. Vav1 interacts with Syk in lung cancer cells

Vav1 and Syk expressions were analysed in different lung cancer cell lines (A549, H460, H441, H358 and HCC827) as shown in Figure 1A. H441, H358 cell lines and, to a lesser extent, HCC827 exhibited both Vav1 and Syk expression. At the opposite, undetectable or very low expression of Vav1 and Syk was observed in A549 and H460. Analysis of Vav2 and Vav3 revealed that Vav2 only was detected in all the different cell lines (Supplemental1A). As described in hematopoietic cells, co-expression of Vav1 and Syk in these three cell lines prompted us to inquire whether both proteins interact. Indeed, Syk was detected from Vav1 immunoprecipitates in the different cell lines (Figure 1B). Since the interaction was conserved in epithelial cells, it strongly suggested the existence of a Syk/Vav1 mediated signaling pathway. To examine the contribution of this pathway to the transformed phenotype of lung cancer cells, H358 cells were stably transduced with virally encoded RNA interference (RNAi) hairpin constructs targeting Vav1 or Syk. The knockdown of Vav1 and Syk in H358 cells by two independent hairpins efficiently decreased the two protein levels as compared to a control hairpin (shSCR) (upon 70 % for Syk and 80% for Vav1) (Figure 1C). Vav1 knockdown obtained with the two hairpins was specific and did not affect the expression of the second member of the family : Vav2 (Supplemental 1B). In depleted cells, proliferation in 2D or 3D cell cultures was not impaired suggesting that Vav1 and Syk were not involved in cell-cycle regulation in the cell lines as previously reported for Vav1 (Supplemental 1C and 1D) [15].

Given that phosphorylation on Y174 is critical for relieving Vav1 from its auto-inhibited conformation by Syk in hematopoietic cells [20], we analyzed the level of Y174 phosphorylation in Syk-depleted cells. Using a specific antibody, we did not detect any significant differences in Y174 phosphorylation of Vav1 compared to control cells (Figure 1C and Supplemental 1E). Both the decrease of Syk expression and the absence of an effect on Vav Y174 phosphorylation were observed upon hairpin transduction of H441 cells (Supplemental 1F-G). These results were confirmed by treatment of the H358 cells with 1  $\mu$ M R406, a chemical inhibitor of Syk kinase activity. Y174 phosphorylation was not significantly modified by the treatment, in contrast with the inhibition of the phosphorylation of ERK1/2, two downstream targets of Syk (Figure 1D and Supplemental 1H). Thus, Syk in the lung cancer model was not responsible for Y174 phosphorylation of Vav1 as observed in hematopoietic cells. Immunoprecipitation of Vav1 and western-blotting with a phosphotyrosine antibody in

Syk-depleted or R406-treated H358 cells revealed a large decrease of Vav1 phosphorylation confirming that Syk triggered Vav1 phosphorylation on residues other than Y174 (Figure 1E).

## **2.2. Vav1 and Syk modulate the migration and invasion via Rho GTPase activity.**

Migration and invasion are critical steps in the initial progression of cancer and facilitate metastasis. To assess the involvement of Vav1 and Syk in the migration capacity of these lung cancer cells we used scratched wound-healing assays. Depletion of Vav1 or Syk in H358 cells resulted in a significant decrease in cell motility (Figure 2A). This result was confirmed in H441 cell line (Supplemental 2A). Moreover, wound closure relied on Syk kinase activity since its chemical inhibition by R406 impaired also cell migration (Figure 2B). In addition, Syk showed a higher impact on cell migration with a stronger decrease of migration upon its depletion as compared to Vav1. This result also argued for Syk acting as an upstream regulator of Vav1. Meanwhile, overexpression of Vav1 and Syk did not increase significantly cell migration in these wound-healing experiments (Supplemental 2B). We next analysed invasion in a Transwell Invasion Assay. Similarly to migration, invasion was significantly impaired in the cell lines depleted for both proteins as being involved in cytoskeleton reorganization (Figure 2C). Given that motility and invasion are associated with lamellopodia or invadopodia, we investigated whether the depletion of Vav1 or Syk might impact Rho GTPases including Rac1, RhoA and Cdc42 by using GST pull-down assays. Both knockdown conditions led to substantial decrease in Rac1 and Cdc42 activity without affecting RhoA activity (Figure 2D). These data were corroborated for Rac1 when Syk and Vav1 were overexpressed in H358 cells (Supplemental 2C). Collectively, our findings suggest that both Vav1 and Syk regulate migration and invasion and both are required for activation of Rac1 and Cdc42. The effect of Syk and Vav on cell migration suggest their involvement in epithelial mesenchymal transition (EMT). In agreement with this hypothesis, both proteins might participate to the acquisition of a mild EMT-like phenotype in these cells as evidenced by a decreased expression of both vimentin and N-cadherin without affecting of E-cadherin levels (Supplemental 2D and 2E). In parallel, we analysed the expression of both c-myc and cyclin D1, two downstream targets of Vav1 and Syk signaling pathway [12, 40]. In Vav1 and Syk-depleted cells, both cyclin D1 and c-myc expression were decreased although cell proliferation was not changed (Figure 2E and Supplemental 2F). Interestingly, both targets are also related to the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in line with the involvement of Rac GTPase. Since we observed an altered migration phenotype



in these cells, we further investigated whether  $\beta$ -catenin that we previously described as a Vav1 interacting protein was involved in this process [41].

### **2.3. $\beta$ -catenin, a new Syk interacting partner in lung cancer cells that phenocopies Vav1 and Syk knock-down.**

The migration defect observed in depleted cells and the reported interaction between Vav1 and  $\beta$ -catenin prompted us to attest whether Syk might also be a partner of  $\beta$ -catenin in lung cancer cells. As shown in Figure 3A,  $\beta$ -catenin specifically precipitated with the Syk kinase and reciprocally in these cells. Since  $\beta$ -catenin, as well as Syk and Vav1, plays an important role in cell migration, we analysed the impact of  $\beta$ -catenin depletion on H358 and H441 motility using scratched wound-healing assays.  $\beta$ -catenin knock-down efficiency using shRNA or siRNA was estimated by Western-blotting and qRT-PCR. In both conditions,  $\beta$ catenin protein levels were significantly reduced and migration was impaired (Figure 3B-C and Supplemental 3A-C). As already shown for Vav1 and Syk, downregulation of Rac1 and Cdc42 GTPases activities were observed in line with the deficient migration. Altogether our data suggest that Syk, Vav1 and  $\beta$ -catenin may interact with each other to regulate migration via Rho GTPases (Figure 3D).

### **2.4. Syk and Vav1 modulate the posttranslational modifications of $\beta$ -catenin.**

Considering that  $\beta$ -catenin functions are controlled by a wide variety of posttranslational modifications and by its subcellular localization, we first investigated whether the latter was modified in Vav1 and Syk-depleted cells. Immunofluorescence experiments on depleted cell lines compared to control cells did not display any differences in  $\beta$ -catenin nuclear staining, which was barely visible (Figure 4A). This result was confirmed by subcellular fractionation indicating that  $\beta$ -catenin was present at the membrane, in the cytoplasm and in the nucleus (Figure 4B).

Using commercially available antibodies specifically covering several epitopes of  $\beta$ catenin post-translational modifications, we next verified the status of serine, threonine or tyrosine phosphorylation as well as lysine acetylation upon depletion of Vav1 and Syk. Several modifications were unaffected by the depletion of both proteins (Supplemental 4A).

However, phosphorylation of S552, Y142 and Y654 residues were significantly reduced with a more pronounced diminution for Syk inhibition (Figure 4C). These decreases in the

phosphorylation status were not associated with an overall reduction of total  $\beta$ -catenin although those have been associated with  $\beta$ -catenin stabilisation in several cell types. These observations were confirmed in H441 cells and by the treatment of H358 cells with the Syk inhibitor, R406. However, total  $\beta$ -catenin slightly decreased under such conditions (Figure 4D). Although both Y142 and Y654 phosphorylation have been linked to the nuclear translocation and the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin, our fractionation experiment did not evidence nuclear accumulation in absence of Syk (Figure 4B).

To corroborate the results obtained in H358 Syk and Vav1-depleted cells, we used the 293T cells in which low levels of Syk and absence of Vav1 were observed. We overexpressed a wild-type or a kinase dead mutant of Syk (indicated as KD) with or without Vav1. In a likely manner to H358 cells, Syk and  $\beta$ -catenin coimmunoprecipitated in 293T cells (Figure 4E). Moreover, expression of wild-type but not KD Syk led to an increase of Y142  $\beta$ -catenin phosphorylation. Interestingly, Y142 phosphorylation was enhanced in the presence of Vav1 suggesting a contributor role for the adaptor (Figure 4F).

We previously reported that Vav1 overexpression did not impact the Wnt-dependent  $\beta$ -catenin transcriptional activation in H358 cells [41]. Thus, we sought to verify whether overexpression of Syk might affect  $\beta$ -catenin transcriptional activity. Using the  $\beta$ -cateninTCF/LEF transcriptional reporter system, we did not observe a significant difference upon Syk overexpression. However, treatment with LiCl, a potent inhibitor of GSK3 $\beta$ -dependent degradation of  $\beta$ -catenin resulted in a substantial induction of the transcriptional response independent of the presence of Syk (Figure 5A). This result confirmed the specific analysis of a Wnt responsive gene Axin2 whose expression was unchanged in Syk depleted cells (Supplemental 5A).

## **2.5. TCF-4/ $\beta$ -catenin complex binds to Syk promoter and regulates its expression.**

To better evaluate the functional interplay between Syk-Vav and  $\beta$ -catenin we analysed the regulation of Syk expression in  $\beta$ -catenin depleted cells. Under such conditions, the level of Syk strongly decreased (Figure 5B and Supplemental 5B, 5D in H441 cells). qRT-PCR analysis confirmed the transcriptional downregulation of Syk (Figure 5C and supplemental 5C). This regulation at the RNA level led us to hypothesize that  $\beta$ -catenin might recognize a regulatory region on Syk promoter. Using Eukaryotic Promoter Database (EPD), three potential binding sites of TCF-4 (TCF7L2)/ $\beta$ -catenin were characterized in the first 2000 base-pairs upstream region of the Syk promoter (Figure 5D). TCF-4/ $\beta$ -catenin binding to the regions covering site

1 (-982), site 2 (-1119) and 3 (-1580) was analysed by a chromatin immunoprecipitation approach (ChIP). Antibody against the modified H3 (H3K36me3) and TCF4 served as positive controls for immunoprecipitation and binding efficiencies. Both TCF-4 and  $\beta$ -catenin bound Axin2 promoter even in absence of Wnt stimulation as compared to the IgG controls (Supplemental 5E). Next, we demonstrated that TCF-4 and  $\beta$ -catenin bind significantly the Syk promoter at sites 1 and 2 but not site 3 (Figure 5D and Supplemental 5FG).

To confirm this transcriptional regulation of Syk by  $\beta$ -catenin, we treated the cells with the PKF118-310 inhibitor known to disrupt the interaction between TCF-4 and  $\beta$ catenin, and preventing  $\beta$ -catenin-dependent gene transcription. Indeed, treatment with PKF118-310 inhibited Axin2 and Syk transcription (Figure 5E). Collectively, those data indicated that TCF-4/ $\beta$ -catenin by binding to its promoter region regulates Syk expression.

### 3. Discussion

The contribution of Vav1 to human cancer has been shown to stem from its ability to function as a signal transducer in tissues in which it is not normally expressed [4, 42]. Vav1 is tyrosine phosphorylated in response to various stimuli in hematopoietic cells as well as cancer cells [12, 14, 20]. Our study demonstrates that Vav1 also interacts with Syk in lung cancer cells whereas Syk expression in this pathological model remains poorly documented [43-45]. Examination of the Cancer Genome Atlas (TCGA) database showed also a significant correlation between Syk and Vav1 expression in a cohort of patients with lung cancer. Although co-immunoprecipitation reports an interaction, Syk does not phosphorylate the residue Y174 of Vav1 similarly to a previous report in acute promyelocytic leukemia cells (NB4) [46]. Analysis of the potential tyrosine phosphorylation sites listed via Phosphonet (<http://www.phosphonet.ca>) predicts that Syk might phosphorylate the residues Y604 and Y836 in the SH3 domains and Y844 at the extreme C-terminus. Although both Y604 and Y844 have not been identified as phosphorylated by mass-spectrometry, phosphorylation state of Y836 contributes to the regulation of Vav1 activity [47]. Further work is required to identify critical Vav1 tyrosine(s) that might be phosphorylated by Syk and to elucidate whether this modification contributes to Vav1 specific functions.

Rac1 as a small GTPase behaves as a central molecular node in cellular transformation. First, deregulated activities of upstream factors contribute to constitutive Rac1 dependent pathways. Drivers of the Rac1 signaling pathway, especially some GEFs, are overexpressed, mutated or

constitutively active in a number of cancer [48] [49, 50]. Second, mutations within the RAC1 gene are also reported and participate to cellular transformation [51]. Our results indicate that Syk and Vav1 through these GTPases exhibit important roles in migration and invasion of lung cancer cells in agreement with reports on other cancer cell types while an opposite role for Syk has also been reported in other cancer cells [22, 50, 52, 53]. Moreover, our data support findings obtained in pancreatic cancer cells demonstrating that the ectopic expression of Vav1 is required for Rac1 and Cdc42 GTPases dependent activities on migration and invasion [54, 55]. Remarkably, in epithelial cells Vav1 functions through Rac1 and cdc42 whereas in hematopoietic cells Vav1 GEF activity targets preferentially Rac1 and RhoA GTPases without affecting cdc42 and overexpression of Syk does not overload this function of Vav1. This difference underscores Vav1 ability to adjust to other stimuli in various cell types. Altogether, we suggest that Vav1/Syk complex participates to cytoskeleton reorganization required for migration and invasion.

Furthermore, our study strengthens the link between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin evidenced by several groups including our and suggests the existence of a complex with these three partners [41, 50, 56, 57]. We confirmed that Syk is involved in the phosphorylation of  $\beta$ -catenin at both Y654 and Y142 tyrosine residues using knock-down or chemical inhibition. Indeed, it has been recently shown that Syk directly phosphorylates  $\beta$ -catenin at Y142 [57] and we show that Vav1 can enhance this phosphorylation as demonstrated by our depletion and overexpression experiments. When present, Vav1 could reinforce the interaction between Syk and  $\beta$ -catenin, the phosphorylation of the latter and the subsequent signaling. Considering the phosphorylation of the Y654 residue commonly assigned to Src kinase, the non-receptor tyrosine kinase Pyk2 has been recently involved in this phosphorylation in pancreatic cancer cells [58] and could be activated by Syk [59]. Moreover, a Rac1/PAK1 or PAK4 cascade controlling  $\beta$ -catenin (S675) phosphorylation and accumulation has been evidenced in colon cancer and melanoma cells respectively [35, 60]. Although the phosphorylation of Y142 and Y654 are contributing to  $\beta$ -catenin nuclear shuttling and transcription, we did not observe a significant decrease in the nuclear pool of  $\beta$ -catenin in the Syk depleted cells [34, 61] and the Wnt-dependent transcription of Axin 2 was not affected.

Our present study also demonstrates that inhibition of  $\beta$ -catenin impairs migration of H358 and H441 cancer cells. Interestingly, like Vav1 and Syk, this altered migration in  $\beta$ -catenin depleted-cells can also be partially imputable to the lack of activation of Rac1 but not Cdc42. A strong physical interaction between Rac1 and  $\beta$ -catenin in the Wnt pathway and Rac1 actively participating to the transcription of  $\beta$ -catenin/TCF target genes are well established [62, 63]. In

line with our data,  $\beta$ -catenin is not only an effector of Rac1 but may reversely acts as an upstream regulator of Rac1. This finding is in agreement with the involvement of the GEFs Tiam1 and Vav2 in triple-negative breast cancer cells [64]. Additional data is needed to figure out how  $\beta$ -catenin acts both as an activator and an effector of Rac1 in various cancer cells. Since Vav1 and Syk can shuttle between cytoplasm and nucleus and also participate to transcriptional complexes [65, 66], one could speculate that Syk also phosphorylates Vav1 and  $\beta$ -catenin in the nucleus leading to specific gene regulation expression.

Furthermore, this work shed light on a regulation of Syk transcription, which has not been extensively studied so far. Regarding the specific expression in cancer cells, promoter investigations focused mainly on the methylation status of Syk gene, which is cell-type dependent [67-71]. For instance, in A549 cells treatment with the 5-aza-CdR demethylation agent reactivated Syk gene expression [72]. We showed that  $\beta$ -catenin/TCF4 is critical for Syk expression, binding directly to the Syk promoter in H358 cells. Importantly, the link between Syk and  $\beta$ -catenin seems regulated at several levels: Syk modifies post-translationally  $\beta$ -catenin and reversely the latter regulates Syk gene transcription via TCF4.  $\beta$ catenin is also expressed in hematopoietic lineage in which Syk plays crucial functions and such regulation might be relevant in malignant or normal B cells. Moreover, it remains to be examined whether  $\beta$ -catenin could regulate Syk gene expression through its interaction with other co-factors such as NF- $\kappa$ B, HIF1 $\alpha$  or FOXO. Indeed, Syk promoter harbors putative binding sites for all these transcription factors [27, 73]. Additionally, PU.1 has been ascribed as a singular regulator of Syk expression [74]. Our data show that  $\beta$ -catenin acts as a novel factor involved in Syk gene expression.

Our primary goal was to contribute to the growing list of reports demonstrating a determining role for the ectopic expression of Vav1 in cancer cells [4, 42]. Its biological importance needs further exploration including impact of the GEF activity but also the adaptor function and particularly through partners such as Syk and  $\beta$ -catenin. Despite many open questions relative to Vav1 contribution to cancer, Vav1 remains a promising target in therapy, especially by blocking its GEF activity like it was demonstrated for the first time in pancreatic cancer. Syk inhibitors as well as  $\beta$ -catenin inhibitors manifest already therapeutic effects on autoimmune disease and B-cells malignancies [75, 76] [28]. With some remaining questions, more studies are required to clarify how this Menage-a-trois operates, while the three partners have independent functions in cancer cells and to translate these findings toward successful treatment in oncology.

## 4. Methods

### Antibodies

The antibodies used in this study were purchased from different commercial sources and are listed in the following table.

**Table 1: Antibodies used in this study.**

<b>Antibody Name</b>	<b>Company</b>	<b>Applications</b>
Anti-Vav1 (#2502)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Vav1 (C14)	Santa Cruz Biotechnology	WB - IP
Anti-Vav1 (B6)	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti- $\beta$ -actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-tubulin (T8328)	Sigma	WB
Anti-Syk	Becton Dickinson	WB - IP
Anti-N-cadherin	Becton Dickinson	WB
Anti-E-cadherin	Becton Dickinson	WB
Anti- $\beta$ -catenin	Becton Dickinson	WB - IP
Anti-Y142- $\beta$ -catenin	ECM Biosciences	WB
Anti-Y654- $\beta$ -catenin	ECM Biosciences	WB
Anti-S552- $\beta$ -catenin (#9566)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-K49-b-catenin (#9030)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S675- $\beta$ -catenin (#9567)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S33/37/T41- $\beta$ -catenin (#9561)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Non-phospho- $\beta$ -catenin (#8814)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Vav2	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-Vav3	Santa Cruz Biotechnology	WB

Anti-phospho Vav1 (9.Tyr174)	Santa Cruz Biotechnology	WB
<b>Antibody Name</b>	<b>Company</b>	<b>Applications</b>
Anti-S45- $\beta$ -catenin (#9564)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-S45/T41- $\beta$ -catenin (#9565)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Y86- $\beta$ -catenin	GeneTex	WB
Anti-phospho-ERK1/2 (#9101)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-ERK1/2 (#9102)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-HSP70 (#4872)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-ATP1A1 (#3010)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-LaminB1 (#13435)	Cell Signaling Technology	WB
Anti-Rac1 (16118)	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti-RhoA (16116)	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti-cdc42 (16119)	Pierce – Thermo Scientific	WB
Anti- $\beta$ -catenin (E247)	Abcam	ChIP
Anti-TCF4 (D-4)	Santa Cruz Biotechnology	ChIP
Mouse IgG	Diagenode	ChIP
Rabbit IgG	Diagenode	ChIP
Anti-H3K36me3	Diagenode	ChIP

### Cell culture and treatment

All cells are grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. H358, H441, H460, A549 and HCC827 cells were cultured in RPMI containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (PAA). HEK293T cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and 1% PAA. Syk inhibitor R406 (Euromedex) was used at 1 $\mu$ M for 1h. PKF118-310 (Sigma-Aldrich) was used at 0.1, 0.2 and 0.3 $\mu$ M for 1h.

## Virus Production and Infection

Viral production and infections were carried out as described in [36, 37]. Briefly, 293T cells were transfected using Trans-IT (Mirus). Viruses were collected 48 hours post transfection. After infection, target cells (H358 and H441) were selected with 1  $\mu$ g/ml of puromycin. The pLKO.1 shSCR; pLKO.1 shVav1; pLKO.1 shSyk; pLKO.1 sh $\beta$ -cat lentiviruses were produced by cotransfection with pCMV $\Delta$ R8.2 and pCMV-VSV-G (8:1 ratio). The sequences used for the hairpins are listed in the following table.

**Table 2: shRNA sequences used in this study.**

Gene	Sequence (5' – 3')
Vav1-1	5'-ACTGTACCGGATCACAGAGA-3'
Vav1-2	5'-CGTCGAGGTCAAGCACATTAA-3'
Syk-1	5'-GCAGGCCATCATCAGTCAGAA-3'
Syk-2	5'-CCTTAGCATGTGACTCCTGAA-3'
$\beta$ -ctn	5'-GAGGTGCTATCTGTCTGCTCTA-3'

## siRNA, plasmid and transfection

siRNA control or targeting  $\beta$ -catenin were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Plasmids encoding Syk and Kinase Dead-Syk (KD) were gifts from Pr Michael Reth (University of Freiburg) to Dr Christine Le Roy [38, 39]. H358 and 293T cell lines were transfected using JetPRIME reagent (Polyplus) and/or Trans-IT (Mirus).

## Cell fractionation and Immunofluorescence

Cell fractionation: Membrane, cytoplasmic and fractions were prepared using the Subcellular cell fractionation kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions starting from 1 million of H358 cells. Protein concentration was quantitated using the BCA protein assay kit (Pierce).

Immunofluorescence: Cells were fixed 20 min with 4% paraformaldehyde/ 4% sucrose (Sigma) followed by 10 min of quenching with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma) and 5 min of permeabilization with 0.2% Triton X-100 (Sigma). After 1 h of blocking with 1% gelatin, cells were incubated 1 h with the mouse anti- $\beta$ -catenin primary antibody (BD Transduction Laboratories; dilution 1:50) and then 45 minutes with anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen;



dilution 1:300). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma; 1  $\mu$ M, 10 min) To prevent any antibody leakage, an additional post-fixation step was performed with 2% paraformaldehyde/ 2% sucrose for 10 min followed by a quenching step with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 5 min. Images were acquired using a DMI6000 Leica Spinning Disk microscope with a 40x 1.25NA objective (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a Photometrics Coolsnap HQ CCD, driven by Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at the Imaging Facility at Cochin Institute, Paris, France. Post-acquisition data analysis was performed using Image J software.

### **Immunoprecipitation and western blot analyses**

Protein extracts were prepared in NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCL [pH 7.5], 150mM NaCl, 10% glycerol, 1mM EDTA, 1% NP-40) containing protease inhibitors (10  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml pepstatin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1mM DTT, 25mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1mM sodium fluoride and 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Proteins were separated by SDS-PAGE transferred to Hybond membrane (Amersham) and probed with appropriate primary and HRP-conjugated secondary Antibodies. Quantitation was performed using Image Lab 4.10 (Bio-Rad). For immunoprecipitation, cell extracts were incubated overnight with the indicated Antibodies after preclearing during 1 hour. Beads were further washed with the lysis buffer and precipitates were eluted in 4X Laemmli buffer prior to immunoblotting.

### **Rac1/RhoA/Cdc42 Activation Assays**

Rac1/RhoA/Cdc42 activation assays were performed using the Active Rac1/RhoA/Cdc42 Pull-Down and Detection Kit. The assays consist on a GST-pull down experiment with the p21-binding domain of PAK1 or the Rhotekin-binding domain that selectively precipitates active Rac1 or RhoA and Cdc42 respectively from whole cell extracts. Active Rac1, RhoA or Cdc42 are quantified by immunoblot analysis using anti-Rac1, anti-Cdc42 and anti-RhoA monoclonal antibodies (Thermo Scientific Pierce).

### **Wound healing assays**

H358 or H441 cells were seeded in 6 or 12-well plates and grown to 90-95% confluency. Subsequently, a scratch was placed in the middle of the well with a sterile 200 $\mu$ l pipette tip. After washing twice with serum-free media, media with only 0,5% FBS was added to the cells to limit cell proliferation. Images were captured immediately after scratching and 24 hours later using a BD pathway Microscope (Magnification x4). Wound closure after 24H was analysed

using ImageJ software according to the ratio: Width of initial wound / Width of final wound. The wound closure value of untreated cells was normalized to 1.

### **Cell invasion assay and Cell proliferation assay**

Invasion assay was carried out by using a Cytoselect 48-well cell invasion assay (Cell Biolabs) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were counted, plated at a density of  $1.106$  cells/mL and incubated for 24 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . After incubation and washings, adherent cells were detached and lysed in a solution containing a fluorescent dye for 20 min. Fluorescence was monitored at 520 nm using a 96-wells plate reader. For cell proliferation assay, cells were seeded into 24 well-plates at a density of 105 cells/well and counted at days 1, 2, 3 and 4.

### **Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay**

3D invasion was performed according to protocol described by manufacturer (Cell Biolabs). Briefly, cells were suspended in RPMI complete growth medium at a density of  $2.104$  cells/ml.  $200\ \mu\text{l}$  were dispensed in a round-bottom 96 well-plates, then incubated for spheroid formation. Four days later,  $100\ \mu\text{l}$  of BMM (basement membrane like matrice, matrigel) were added to allow invasion. Arbitrary spheroid area measurements were obtained with ImageJ software using a BD pathway Microscope (at  $2.5\text{X}$  magnification).

### **Luciferase reporter assay**

293T cells were seeded in 12-well-plates 24h prior to transfection using JetPrime (Polyplus) with Syk construct, Top-firefly or Fop-firefly negative control luciferase plasmids (Millipore) and Renilla luciferase plasmid under the control of SV40 promoter, pRL (Promega). 48h after transfection, cell lysis was performed using the Passive Lysis buffer followed by the Dual luciferase assay (Promega). Firefly and Renilla luciferase activities were monitored following manufacturer's instructions. Treatment with LiCl ( $30\text{mM}$ ) was applied 3 hours prior to lysis as a control inhibition of GSK3. Top-firefly luciferase values were normalized to the respective Renilla and Fop-luciferase values for each treatment.

### **Chromatin Immunoprecipitation**

ChIP assays were performed from approximately  $4.106$  cells per experiment, according to manufacturer's protocol (ChIP-qPCR Diagenode). Briefly, cells were crosslinked with ChIP cross-link gold (Diagenode) for 30 min at room temperature followed with 1% formaldehyde

crosslinking for 10 min. Formaldehyde was quenched by addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. Chromatin was sonicated, using Bioruptor (Diagenode). A total of 2–4  $\mu$ g of antibody previously bound to beads was added to the sonicated chromatin and incubated overnight at 4 °C. 1% of chromatin used reaction was kept as input DNA. Magnetic beads were washed and chromatin eluted, followed by reversal of the crosslinkings and DNA purification. Resultant ChIP DNA was dissolved in water and used as a template for PCR.

**Table 3: Primers used in ChIP assays.**

Promoter	Primer Forward	Primer Reverse
Syk site 1	5'-CCCATTGCGAAATCATTCACTACT-3'	5'-TTCTGCTTCCAGGGTTATTGG-3'
Syk site 2	5'-CAATCCCAGTGGCCATACTT-3'	5'-TTGGAGGTAAGGCAGAGAAAC-3'
Syk site 3	5'-CATCAGGTGAAAGCCTGAGAA-3'	5'-GTCAGCATTATTGGAGATGAACAC-3'
Axin	5'-CGGTTGGCGAAAGTTTGC-3'	5'-GGACTCGGGAGCCTAAAGGT-3'

### Quantitative reverse transcription PCR

RNAs were extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) followed by RNeasy Mini kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed with iScript cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's protocol (Biorad). All genes expressions were analyzed by quantitative RT-PCR with SYBR Green reagents using the StepOnePlus™ System instrument (ThermoFisher scientific). Results were normalized to  $\beta$ 2-microglobulin and all experiments were done in triplicate. Primers used for amplification were purchased from Eurogentec :

**Table 4: Primers used for quantitative RT-PCR**

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
E-cadherin	5'-CCGAGGACTTTGGCGTGGGC -3'	5'-TCCCTGTCCAGCTCAGCCCG -3'
N-cadherin	5'-GACCCAAACAGCAACGACGGGT-3'	5'-CTGAGGCGGGTGCTGAATTCCC-3'
Vimentin	5'-GGCTCGTCACCTTCGTGAAT-3'	5'-GCAGAGAAATCCTGCTCTCCT-3'
Syk	5'-AGAAGTTCGACACGCTCTGG-3'	5'-ACATTTCCCTGTGTGCCGAT-3'
$\beta$ -catenin	5'- CGTGACATCAGGATACCCA-3'	5'- ATTCTTCCATGCGGACCCC -3'

<b>Axin2</b>	5'- GGACAGGAATCATTCCGGCCA -3'	5'- ACCTGCCAGTTTCTTTGGCT -3'
<b>Cyclin D1</b>	5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3'	5'-GCTCTTTTTTCACGGGCTCCA-3'
<b>c-myc</b>	5'- CTCCGTCTCCGGATTCTCTG -3'	5'- CTTGTTCCCTCCTCAGAGTCGC -3'
<b>β-2microglobulin</b>	5'- CTCCGTGGCCTTAGCTGTG -3'	5'- TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT -3'

### Statistical analysis

Statistical significance was assessed using unpaired Student's t test (Prism5.0, Graph Pad Software). P values <0.05 were considered significant with the following degrees: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### 5. Figures legends

Figure 1. **Interaction between Vav1 and Syk in lung epithelial cancer cell lines.** **A.** Vav1 and Syk protein expressions in lung cancer cell lines. Total cell extracts (50µg) were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies (Abs) and tubulin was used as a loading control. **B.** Total cell extracts (1mg) from the indicated cells were immunoprecipitated (IP) with anti-Vav1 or control IgG antibodies. Immune complexes or total extracts from the different cell lines were analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. **C.** Cellular levels of Vav1 phosphorylated on tyrosine 174 (Y174) was analysed in H358 control or knockdown cells **D.** H358 cells were treated prior to analysis with 1µM R406 . GAPDH was used as a loading control. **E.** Total cell extracts from control or knockdown H358 cells as well as H358 cells treated with 1µM R406 were immunoprecipitated using anti-Vav1 Ab. Immunoprecipitates were analyzed with anti-phospho-tyrosine or anti-Vav1 Abs.

Figure 2. **Regulation of cell migration and invasion via Rho GTPases activities.** **A.** Control or knockdown H358 cells were analysed in a wound-healing assay. Representative pictures at the indicated time points from three independent experiments are shown (mean ± sem) relative to the recovery obtained with control cells. (Magnification: X4). **B.** Wound recovery in H358 cell treated with DMSO or 1µM R406. Wound closure (mean ± sem) was calculated relative to control cells **C.** Cell invasion was assessed using a fluorimetric invasion assay on stable knockdown H358 cells over 24 hours. **D.** Rho GTPase activation. Rac1/RhoA/Cdc42 activities were assessed in knockdown cells using GST-pull-down experiments. Total cell extracts were

analyzed with the indicated Abs. **E.** RT-qPCR to assess the expression of c-myc in knockdown cell lines relative to housekeeping gene expression.

Significance was determined by Student's t test : \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001;\*\*\*\*p<0.0001

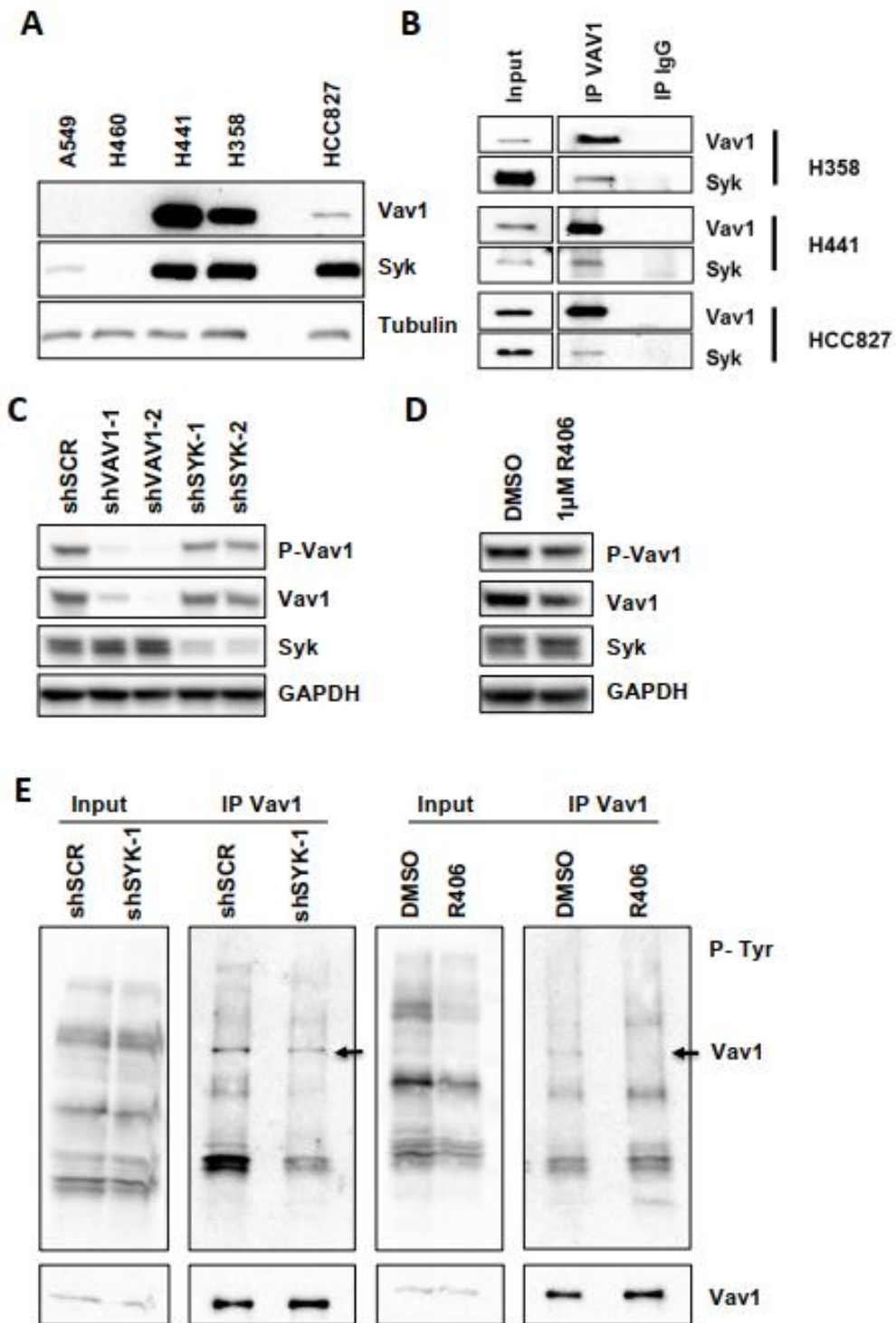
Figure 3. *Interaction between  $\beta$ -catenin and Syk, impact on cell migration.* **A.** Total cell extracts (1mg) from H358 cells were immunoprecipitated using either anti- $\beta$ -catenin, anti-Syk or isotype IgG Abs. Immune complexes or total extracts were analyzed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. **B.** Stable knockdown for  $\beta$ -catenin in H358 cells by virus-based RNAi was determined by immunoblotting and tubulin was used as a loading control. **C.** Control or knockdown H358 cells were subjected to a wound-healing assay. Wound closure was calculated relative to control cells at the indicated times. Representative experiments (mean  $\pm$  sem) of three independent assays are shown. **D.** Rho GTPase activation. Rac1/RhoA/cdc42 activities were assessed in stable H358 knockdown cells using GST-pulldown experiments. Total cell extracts were analyzed as a control with the indicated Abs. ( $\beta$ ctn :  $\beta$ -catenin).

Figure 4. *Syk and Vav1 modulate posttranslational modifications of  $\beta$ -catenin.* **A.**

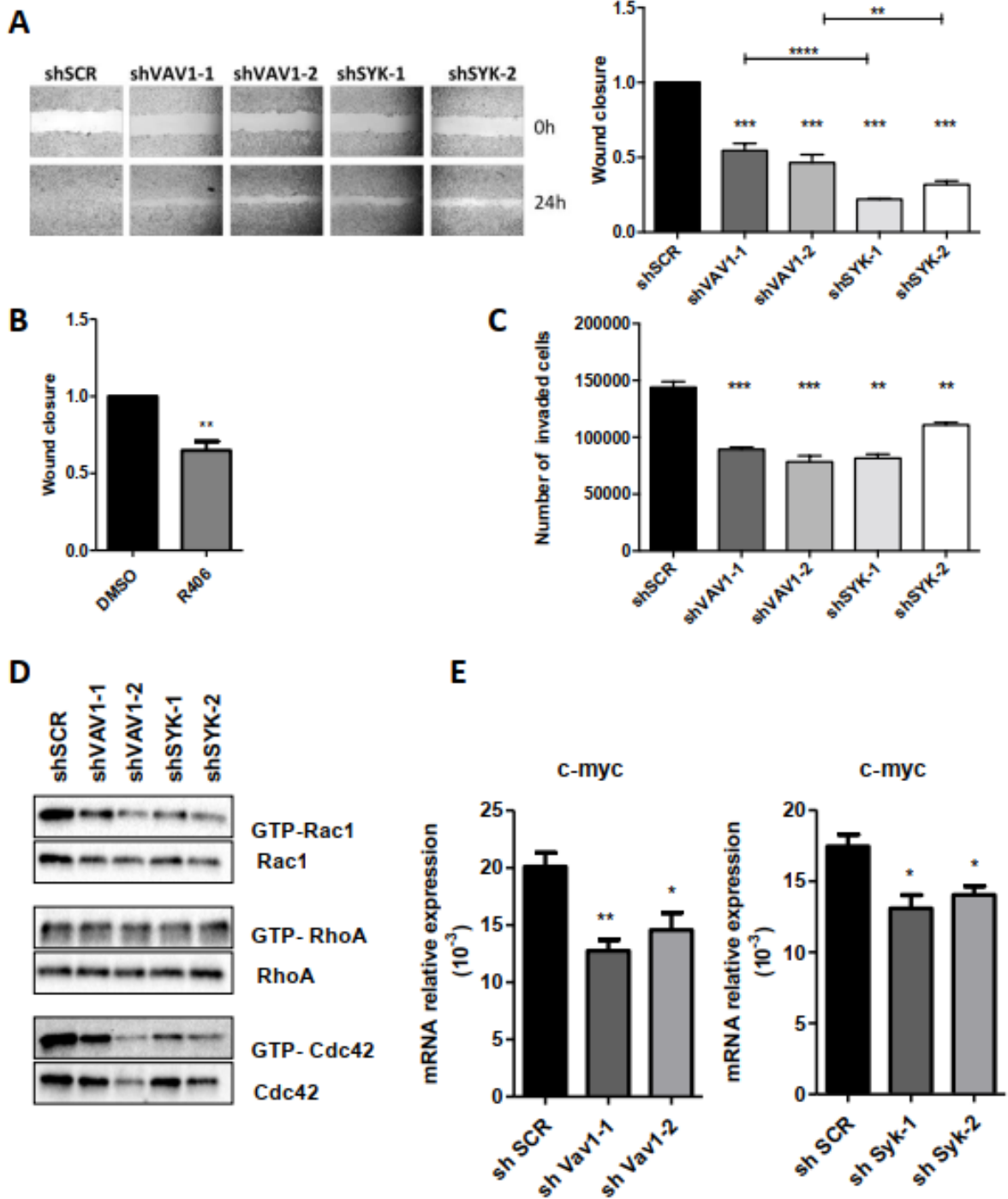
Immunofluorescence analysis of  $\beta$ -catenin localisation in H358 cell lines. The indicated stable H358 cell lines were analysed after anti- $\beta$ -catenin immunostaining (green) by confocal microscopy. Hoescht labelling indicates the nucleus (blue) **B.**  $\beta$ -catenin subcellular localisation. Sequential western blotting was performed with the indicated Abs after subcellular fractionation. Anti-ATP1A1, HSP70 and Lamin B1 Abs were used to assess the purity of the membrane, cytoplasmic and nuclear fractions respectively. **C. & D.**  $\beta$ -catenin posttranslational modifications. Total cell extracts from control and knockdown cells (**C**) or R406 H358 treated cells (**D**) were analyzed by sequential western-blotting with the indicated Abs. Actin was used as a loading control. Phosphorylation of ERK1/2 was used as a positive control of R406 treatment. **E.** Total cell extracts from 293T cells transfected with plasmid encoding Syk were immunoprecipitated using either anti- $\beta$ -catenin, anti-Syk or isotype IgG Abs. Immune complexes or total extracts were analyzed by sequential immunoblotting with the indicated Abs. **F.** 293T cells were transfected with plasmids encoding Vav1 or Syk or Kinase-dead Syk (KD). Total cell lysates were analysed by sequential western blotting with the indicated Abs. Tubulin was used as a loading control.

**Figure 5. *TCF4/  $\beta$ -catenin complex binds to Syk promoter and regulates its expression.*** **A.** TCF/Lef-luciferase reporter activation was evaluated in 293T cells 48h after transfection with the indicated constructs and treatment (Empty-LiCl, Syk-LiCl) or not (Empty, Syk) with 30 mM LiCl. Expression was calculated as a ratio between TOP and FOP luciferase activities. Results are means  $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicates. **B.** Protein expression of Syk in  $\beta$ -catenin knockdown H358 cells analyzed by immunoblotting. **C.** mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. **D.** Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP). H358 cell extracts were immunoprecipitated with anti- $\beta$ -catenin or anti-TCF4, rabbit or mouse IgG antibodies were used as negative controls respectively. Primers were designed to amplify three TCF4 predictive binding sites on Syk promoter. They were used to detect the respective DNA regions in the immunoprecipitate. The fold enrichment was calculated as ratio of  $2^{-\Delta\Delta CT}$  values of the immunoprecipitate with anti- $\beta$ -catenin and rabbit IgG control or anti-TCF4 and mouse IgG. The histogram represents the means $\pm$ SEM of six independent ChIP assays. **E.** RT-qPCR assessment of the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin in H358 treated cells. Total RNAs were extracted and the Syk expression was analyzed. Axin2 gene expression was used as a positive control for PKF118-310 treatment. The housekeeping gene used was  $\beta$ 2 microglobulin. Significance was determined by Student's t test : \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

**Figure: 1**

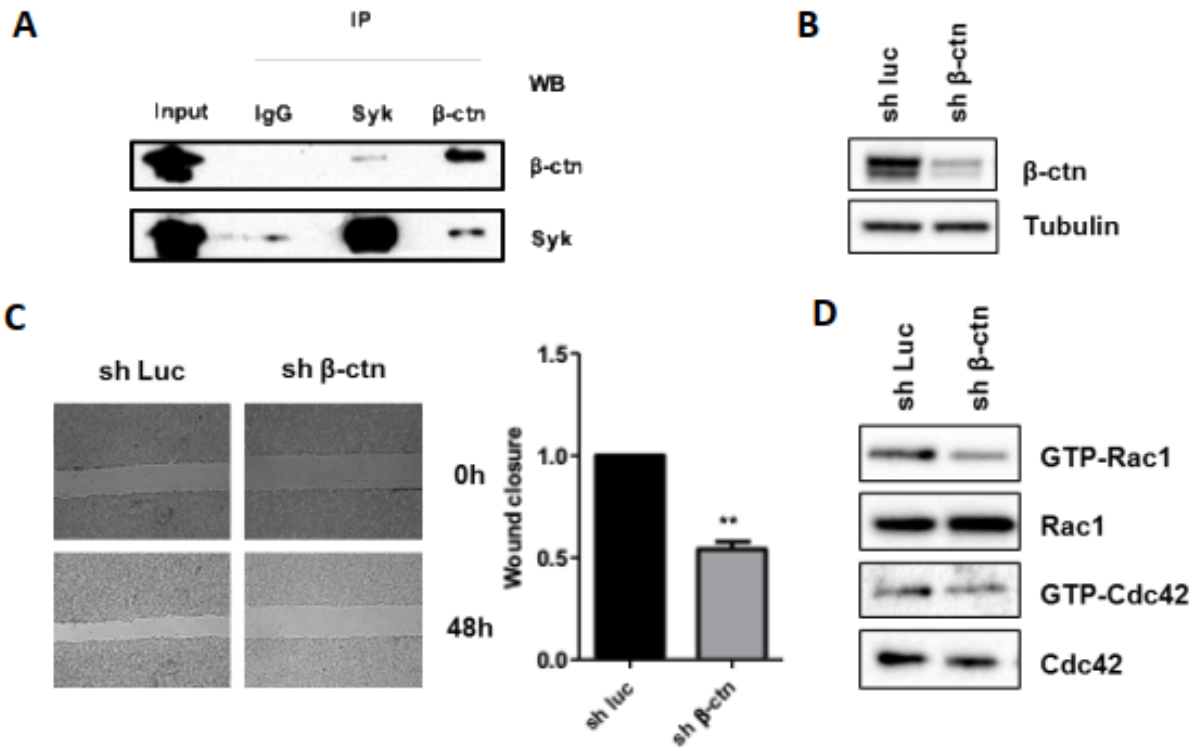


**Figure: 2**





**Figure: 3**

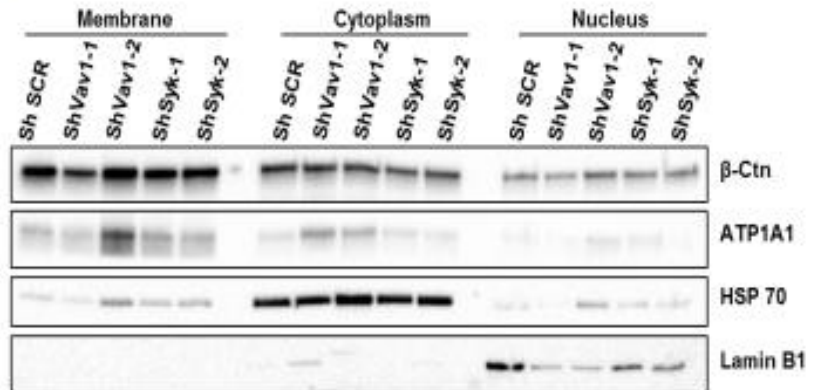


**Figure: 4**

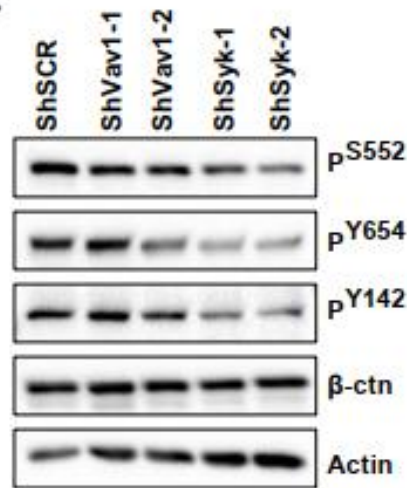
**A**



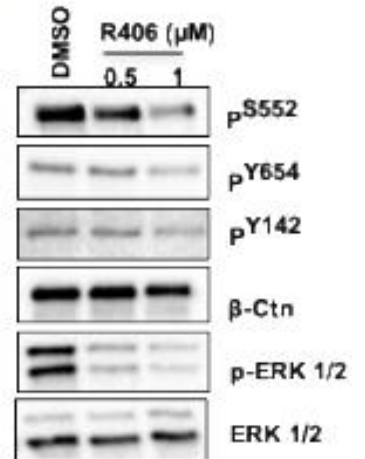
**B**



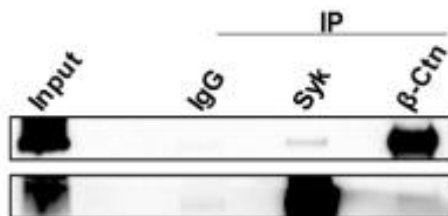
**C**



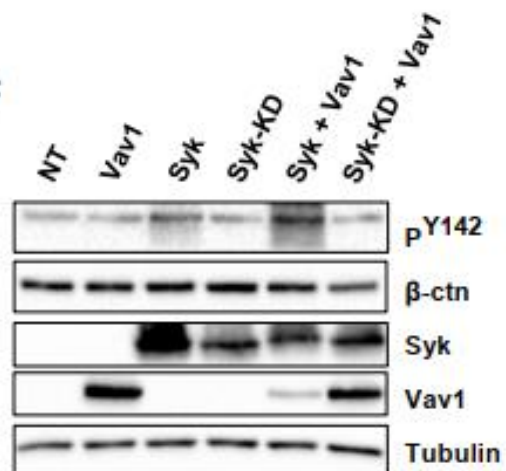
**D**



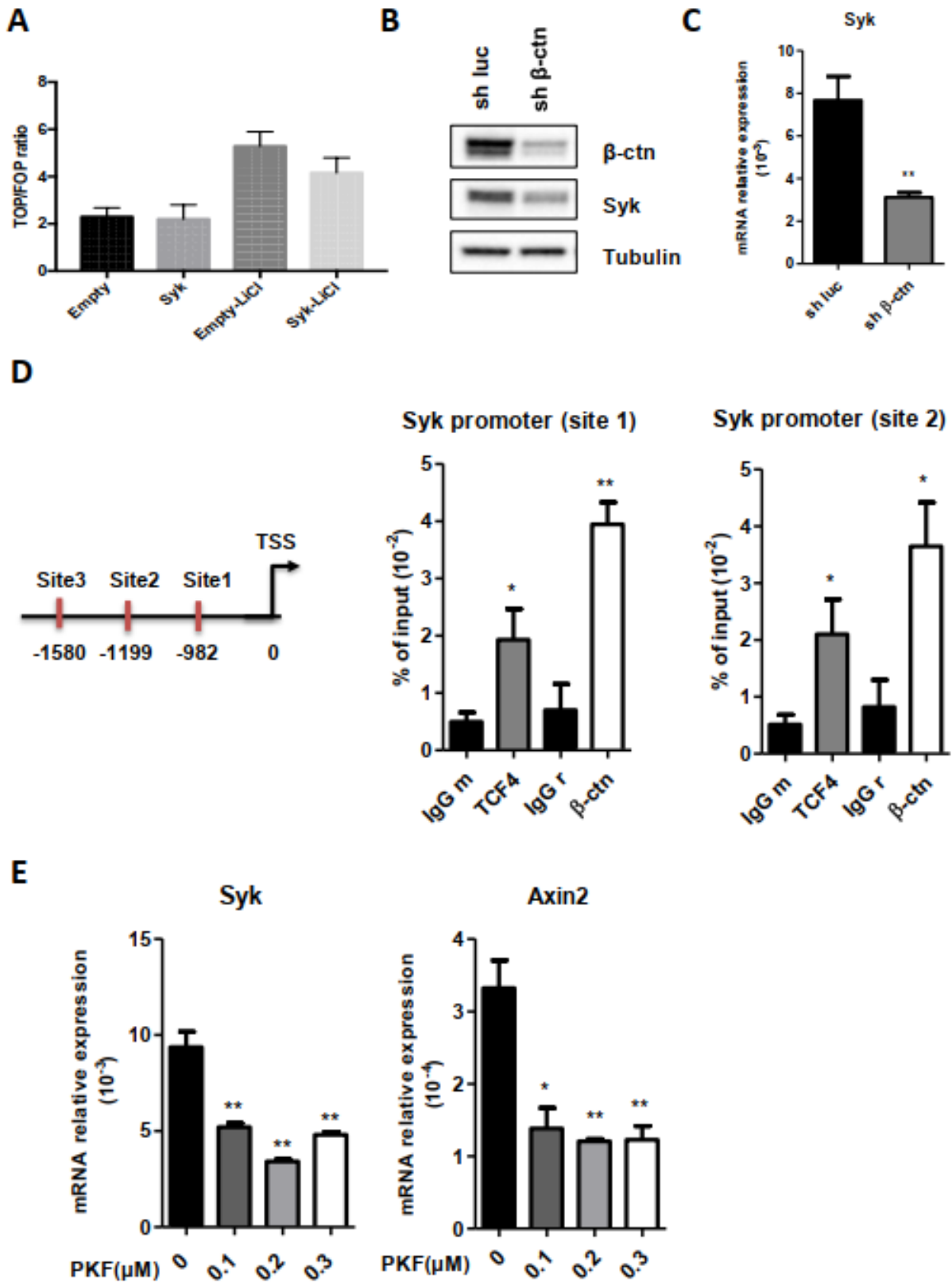
**E**



**F**



**Figure: 5**



## **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Author contributions**

LG, RB and NVB designed the study and co-wrote the paper. RB, VL, AO, ED and SHR, performed experiments and analysed the data. CLR and LGa provided advice in the design of the experiments and critical reading of the manuscript.

## **Acknowledgements**

RB and VL were recipients of fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France. This project was supported by Labex Inflammex. We thank L. Aubard for technical support. L. Guittat warmly thanks S.A. Stewart for lentiviral vectors.

## **References :**

- [1] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, How does multistep tumorigenesis really proceed?, *Cancer Discov* 5(1) (2015) 22-4.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144(5) (2011) 646-74.
- [3] X.R. Bustelo, Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view, *Small GTPases* 5(2) (2014) 9.
- [4] S. Katzav, Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein--good for the hematopoietic system, bad for cancer, *Oncotarget* 6(30) (2015) 28731-42.
- [5] G. Lazer, S. Katzav, Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?, *Cell Signal* 23(6) (2011) 969-79.
- [6] V.L. Tybulewicz, Vav-family proteins in T-cell signalling, *Curr Opin Immunol* 17(3) (2005) 267-74.
- [7] S. Rodríguez-Fdez, X.R. Bustelo, The Vav GEF Family: An Evolutionary and Functional Perspective, *Cells* 8(5) (2019).
- [8] S. Katzav, D. Martin-Zanca, M. Barbacid, vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells, *EMBO J* 8(8) (1989) 2283-90.
- [9] J.D. Campbell, A. Alexandrov, J. Kim, J. Wala, A.H. Berger, C.S. Peadamallu, S.A. Shukla, G. Guo, A.N. Brooks, B.A. Murray, M. Imielinski, X. Hu, S. Ling, R. Akbani, M.

- Rosenberg, C. Cibulskis, A. Ramachandran, E.A. Collisson, D.J. Kwiatkowski, M.S. Lawrence, J.N. Weinstein, R.G. Verhaak, C.J. Wu, P.S. Hammerman, A.D. Cherniack, G. Getz, M.N. Artyomov, R. Schreiber, R. Govindan, M. Meyerson, C.G.A.R. Network, Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, *Nat Genet* 48(6) (2016) 607-16.
- [10] F. Abate, A.C. da Silva-Almeida, S. Zairis, J. Robles-Valero, L. Couronne, H. Khiabani, S.A. Quinn, M.Y. Kim, M.A. Laginestra, C. Kim, D. Fiore, G. Bhagat, M.A. Piris, E. Campo, I.S. Lossos, O.A. Bernard, G. Inghirami, S. Pileri, X.R. Bustelo, R. Rabadan, A.A. Ferrando, T. Palomero, Activating mutations and translocations in the guanine exchange factor VAV1 in peripheral T-cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(4) (2017) 764769.
- [11] I. Hornstein, E. Pikarsky, M. Groysman, G. Amir, N. Peylan-Ramu, S. Katzav, The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas, *J Pathol* 199(4) (2003) 526-33.
- [12] M.E. Fernandez-Zapico, N.C. Gonzalez-Paz, E. Weiss, D.N. Savoy, J.R. Molina, R. Fonseca, T.C. Smyrk, S.T. Chari, R. Urrutia, D.D. Billadeau, Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis, *Cancer Cell* 7(1) (2005) 39-49.
- [13] R.A. Bartolomé, I. Molina-Ortiz, R. Samaniego, P. Sánchez-Mateos, X.R. Bustelo, J. Teixidó, Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion, *Cancer Res* 66(1) (2006) 24858.
- [14] G. Lazer, Y. Idelchuk, V. Schapira, E. Pikarsky, S. Katzav, The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis, *J Pathol* 219(1) (2009) 25-34.
- [15] S. Sebban, M. Farago, S. Rabinovich, G. Lazer, Y. Idelchuck, L. Ilan, E. Pikarsky, S. Katzav, Vav1 promotes lung cancer growth by instigating tumor-microenvironment cross-talk via growth factor secretion, *Oncotarget* 5(19) (2014) 9214-26.
- [16] J.C. Lindsey, D. Kawauchi, E.C. Schwalbe, D.J. Solecki, M.P. Selby, P.J. McKinnon, J.M. Olson, J.T. Hayden, R.G. Grundy, D.W. Ellison, D. Williamson, S. Bailey, M.F. Roussel, S.C. Clifford, Cross-species epigenetics identifies a critical role for VAV1 in SHH subgroup medulloblastoma maintenance, *Oncogene* 34(36) (2015) 4746-57.
- [17] B. Shalom, M. Farago, E. Pikarsky, S. Katzav, Vav1 mutations identified in human cancers give rise to different oncogenic phenotypes, *Oncogenesis* 7(10) (2018) 80.
- [18] M. Menacho-Márquez, R. García-Escudero, V. Ojeda, A. Abad, P. Delgado, C. Costa, S. Ruiz, B. Alarcón, J.M. Paramio, X.R. Bustelo, The Rho exchange factors Vav2 and Vav3

favor skin tumor initiation and promotion by engaging extracellular signaling loops, *PLoS Biol* 11(7) (2013) e1001615.

[19] C. Citterio, M. Menacho-Márquez, R. García-Escudero, R.M. Larive, O. Barreiro, F. Sánchez-Madrid, J.M. Paramio, X.R. Bustelo, The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells, *Sci Signal* 5(244) (2012) ra71.

[20] M. Deckert, S. Tartare-Deckert, C. Couture, T. Mustelin, A. Altman, Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product, *Immunity* 5(6) (1996) 591-604.

[21] A. Mócsai, J. Ruland, V.L. Tybulewicz, The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions, *Nat Rev Immunol* 10(6) (2010) 387-402.

[22] M.O. Krisenko, R.L. Geahlen, Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer, *Biochim Biophys Acta* 1853(1) (2015) 254-63.

[23] P.J. Coopman, S.C. Mueller, The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression, *Cancer Lett* 241(2) (2006) 159-73.

[24] A. Singh, P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Violette, N. Bardeesy, J. Settleman, A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival, *Cancer Cell* 15(6) (2009) 489-500.

[25] Y.M. Sung, X. Xu, J. Sun, D. Mueller, K. Sentissi, P. Johnson, E. Urbach, F. SeillierMoiseiwitsch, M.D. Johnson, S.C. Mueller, Tumor suppressor function of Syk in human MCF10A in vitro and normal mouse mammary epithelium in vivo, *PLoS One* 4(10) (2009) e7445.

[26] S. Wakahashi, T. Sudo, N. Oka, S. Ueno, S. Yamaguchi, K. Fujiwara, C. Ohbayashi, R. Nishimura, VAV1 represses E-cadherin expression through the transactivation of Snail and Slug: a potential mechanism for aberrant epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer, *Transl Res* 162(3) (2013) 181-90.

[27] T. Valenta, G. Hausmann, K. Basler, The many faces and functions of  $\beta$ -catenin, *EMBO J* 31(12) (2012) 2714-36.

[28] X. Zhang, L. Wang, Y. Qu, Targeting the  $\beta$ -catenin signaling for cancer therapy, *Pharmacol Res* (2020) 104794.

[29] M. Koni, V. Pinnarò, M.F. Brizzi, The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer, *Int J Mol Sci* 21(20) (2020).

[30] O. Tetsu, F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature* 398(6726) (1999) 422-6.

- [31] T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281(5382) (1998) 1509-12.
- [32] E.H. Jho, T. Zhang, C. Domon, C.K. Joo, J.N. Freund, F. Costantini, Wnt/betacatenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway, *Mol Cell Biol* 22(4) (2002) 1172-83.
- [33] J.L. Stamos, W.I. Weis, The  $\beta$ -catenin destruction complex, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1) (2013) a007898.
- [34] Y. Xi, Y. Wei, B. Sennino, A. Ulsamer, I. Kwan, A.N. Brumwell, K. Tan, M.K. Aghi, D.M. McDonald, D.M. Jablons, H.A. Chapman, Identification of pY654- $\beta$ -catenin as a critical co-factor in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling and tumor responses to hypoxia, *Oncogene* 32(42) (2013) 5048-57.
- [35] G. Zhu, Y. Wang, B. Huang, J. Liang, Y. Ding, A. Xu, W. Wu, A Rac1/PAK1 cascade controls  $\beta$ -catenin activation in colon cancer cells, *Oncogene* 31(8) (2012) 1001-12.
- [36] A. Saharia, L. Guittat, S. Crocker, A. Lim, M. Steffen, S. Kulkarni, S.A. Stewart, Flap endonuclease 1 contributes to telomere stability, *Curr Biol* 18(7) (2008) 496-500.
- [37] S.A. Stewart, D.M. Dykxhoorn, D. Palliser, H. Mizuno, E.Y. Yu, D.S. An, D.M. Sabatini, I.S. Chen, W.C. Hahn, P.A. Sharp, R.A. Weinberg, C.D. Novina, Lentivirusdelivered stable gene silencing by RNAi in primary cells, *RNA* 9(4) (2003) 493-501. [38] M. Cottat, R. Yasukuni, Y. Homma, N. Lidgi-Guigui, N. Varin-Blank, M. Lamy de la Chapelle, C. Le Roy, Phosphorylation impact on Spleen Tyrosine kinase conformation by Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Sci Rep* 7 (2017) 39766.
- [39] B. Heizmann, M. Reth, S. Infantino, Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43) (2010) 18563-8.
- [40] H. Sun, D.C. Lin, Q. Cao, B. Pang, D.D. Gae, V.K.M. Lee, H.J. Lim, N. Doan, J.W. Said, S. Gery, M. Chow, A. Mayakonda, C. Forscher, J.W. Tyner, H.P. Koeffler, Identification of a Novel SYK/c-MYC/MALAT1 Signaling Pathway and Its Potential Therapeutic Value in Ewing Sarcoma, *Clin Cancer Res* 23(15) (2017) 4376-4387.
- [41] L. Razanadrakoto, F. Cormier, V. Laurienté, E. Dondi, L. Gardano, S. Katzav, L. Guittat, N. Varin-Blank, Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation, *Oncotarget* 6(4) (2015) 2524-37.
- [42] M. Farago, T. Yarnitzky, B. Shalom, S. Katzav, Vav1 mutations: What makes them oncogenic?, *Cell Signal* 65 (2020) 109438.

- [43] S.W. Dong, L. Ma, N. Xu, H.Q. Yan, H.Y. Liu, Y.W. Li, P. Zhang, Research on the reactivation of Syk expression caused by the inhibition of DNA promoter methylation in the lung cancer, *Neoplasma* 58(1) (2011) 89-95.
- [44] A.R. Udyavar, M.D. Hoeksema, J.E. Clark, Y. Zou, Z. Tang, Z. Li, M. Li, H. Chen, A. Statnikov, Y. Shyr, D.C. Liebler, J. Field, R. Eisenberg, L. Estrada, P.P. Massion, V. Quaranta, Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer, *BMC Syst Biol* 7 Suppl 5 (2013) S1.
- [45] A. Singh, J. Settleman, Oncogenic K-ras "addiction" and synthetic lethality, *Cell Cycle* 8(17) (2009) 2676-7.
- [46] V. Bertagnolo, S. Grassilli, S. D'Aguzzo, F. Brugnoli, A. Bavelloni, I. Faenza, E. Nika, A. Urbani, L. Cocco, S. Capitani, Mass spectrometry-based identification of Y745 of Vav1 as a tyrosine residue crucial in maturation of acute promyelocytic leukemia-derived cells, *J Proteome Res* 9(2) (2010) 752-60.
- [47] M. Barreira, S. Fabbiano, J.R. Couceiro, E. Torreira, J.L. Martínez-Torrecuadrada, G. Montoya, O. Llorca, X.R. Bustelo, The C-terminal SH3 domain contributes to the intramolecular inhibition of Vav family proteins, *Sci Signal* 7(321) (2014) ra35.
- [48] X.R. Bustelo, RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges, *Biochem Soc Trans* 46(3) (2018) 741-760.
- [49] M. Cooke, M.J. Baker, M.G. Kazanietz, Rac-GEF/Rac Signaling and Metastatic Dissemination in Lung Cancer, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020) 118.
- [50] T. Kassouf, R.M. Larive, A. Morel, S. Urbach, N. Bettache, M.C. Marcial Medina, F. Mèrezègue, G. Freiss, M. Peter, F. Boissière-Michot, J. Solassol, P. Montcourrier, P. Coopman, The Syk Kinase Promotes Mammary Epithelial Integrity and Inhibits Breast Cancer Invasion by Stabilizing the E-Cadherin/Catenin Complex, *Cancers (Basel)* 11(12) (2019).
- [51] A.C. Cannon, C. Uribe-Alvarez, J. Chernoff, RAC1 as a Therapeutic Target in Malignant Melanoma, *Trends Cancer* 6(6) (2020) 478-488.
- [52] S. Luangdilok, C. Box, L. Patterson, W. Court, K. Harrington, L. Pitkin, P. Rhys-Evans, P. O-charoenrat, S. Eccles, Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck, *Cancer Res* 67(16) (2007) 7907-16. [53] X. Wang, M. Mychajlowycz, C. Lau, C. Gutierrez, J.A. Scott, C.W. Chow, Spleen tyrosine kinase mediates BEAS-2B cell migration and proliferation and human rhinovirus-induced expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8, *J Pharmacol Exp Ther* 340(2) (2012) 277-85.



- [54] G.L. Razidlo, C. Magnine, A.C. Sletten, R.M. Hurley, L.L. Almada, M.E. FernandezZapico, B. Ji, M.A. McNiven, Targeting Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibition of Vav1, a Driver of Tumor Cell Invasion, *Cancer Res* 75(14) (2015) 2907-15.
- [55] G.L. Razidlo, B. Schroeder, J. Chen, D.D. Billadeau, M.A. McNiven, Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly, *Curr Biol* 24(1) (2014) 86-93.
- [56] R.M. Larive, S. Urbach, J. Poncet, P. Jouin, G. Mascré, A. Sahuquet, P.H. Mangeat, P.J. Coopman, N. Bettache, Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion, *Oncogene* 28(24) (2009) 2337-47.
- [57] D. Bhardwaj, M. Náger, A. Visa, M.C. Sallán, P.J. Coopman, C. Cantí, J. Herreros, Phosphorylated Tyr142  $\beta$ -catenin localizes to centrosomes and is regulated by Syk, *J Cell Biochem* 119(4) (2018) 3632-3640.
- [58] C. Gao, G. Chen, D.H. Zhang, J. Zhang, S.F. Kuan, W. Hu, F. Esni, X. Gao, J.L. Guan, E. Chu, J. Hu, PYK2 Is Involved in Premalignant Acinar Cell Reprogramming and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Maintenance by Phosphorylating  $\beta$ -Catenin, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8(4) (2019) 561-578.
- [59] H. Okazaki, J. Zhang, M.M. Hamawy, R.P. Siraganian, Activation of protein-tyrosine kinase Pyk2 is downstream of Syk in Fc $\epsilon$ RI signaling, *J Biol Chem* 272(51) (1997) 32443-7.
- [60] C.Y. Yun, S.T. You, J.H. Kim, J.H. Chung, S.B. Han, E.Y. Shin, E.G. Kim, p21activated kinase 4 critically regulates melanogenesis via activation of the CREB/MITF and  $\beta$ catenin/MITF pathways, *J Invest Dermatol* 135(5) (2015) 1385-1394.
- [61] M. Náger, M. Santacana, D. Bhardwaj, J. Valls, I. Ferrer, P. Nogués, C. Cantí, J. Herreros, Nuclear phosphorylated Y142  $\beta$ -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion, *Cell Cycle* 14(22) (2015) 3644-55.
- [62] X. Wu, X. Tu, K.S. Joeng, M.J. Hilton, D.A. Williams, F. Long, Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling, *Cell* 133(2) (2008) 34053.
- [63] S. Esufali, B. Bapat, Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation, *Oncogene* 23(50) (2004) 8260-71.
- [64] P. De, J.H. Carlson, T. Jepperson, S. Willis, B. Leyland-Jones, N. Dey, RAC1 GTP-ase signals Wnt-beta-catenin pathway mediated integrin-directed metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers, *Oncotarget* 8(2) (2017) 3072-3103.

- [65] D. Gao, L. Wang, H. Zhang, X. Yan, J. Yang, R. Zhou, X. Chang, Y. Sun, S. Tian, Z. Yao, K. Zhang, Z. Liu, Z. Ma, Spleen tyrosine kinase SYK(L) interacts with YY1 and coordinately suppresses SNAI2 transcription in lung cancer cells, *FEBS J* 285(22) (2018) 4229-4245.
- [66] M. Houlard, R. Arudchandran, F. Regnier-Ricard, A. Germani, S. Gisselbrecht, U. Blank, J. Rivera, N. Varin-Blank, Vav1 is a component of transcriptionally active complexes, *J Exp Med* 195(9) (2002) 1115-27.
- [67] J. Blancato, A. Graves, B. Rashidi, M. Moroni, L. Tchobe, M. Ozdemirli, B. Kallakury, K.H. Makambi, C. Marian, S.C. Mueller, SYK allelic loss and the role of Syk-regulated genes in breast cancer survival, *PLoS One* 9(2) (2014) e87610.
- [68] S.H. Shin, K.H. Lee, B.H. Kim, S. Lee, H.S. Lee, J.J. Jang, G.H. Kang, Downregulation of spleen tyrosine kinase in hepatocellular carcinoma by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis, *Lab Invest* 94(12) (2014) 1396-405.
- [69] Z. Yang, L. Huo, H. Chen, B. Ni, J. Xiang, L. Kang, L. Wang, J. Peng, Y. Yuan, J. Wang, Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer, *Med Oncol* 30(2) (2013) 586.
- [70] Q. Jin, C. Liu, C. Yan, B. Tao, Z. Li, Z. Cai, 5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell, *Gene* 511(2) (2012) 224-6.
- [71] C. Yan, C. Liu, Q. Jin, Z. Li, B. Tao, Z. Cai, The promoter methylation of the Syk gene in nasopharyngeal carcinoma cell lines, *Oncol Lett* 4(3) (2012) 505-508.
- [72] L. Ma, S. Dong, P. Zhang, N. Xu, H. Yan, H. Liu, Y. Li, Q. Zhou, The relationship between methylation of the Syk gene in the promoter region and the genesis of lung cancer, *Clin Lab* 56(9-10) (2010) 407-16.
- [73] G. Lazarian, C. Friedrich, A. Quinquenel, J. Tran, S. Ouriemmi, E. Dondi, A. Martin, I. Mihoub, D. Chiron, C. Bellanger, C. Fleury, P. Gelebart, E. McCormack, D. Ledoux, C. Thieblemont, J. Marzec, J.G. Gribben, F. Cymbalista, N. Varin-Blank, L. Gardano, F. BaranMarszak, Stabilization of beta-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma, *Oncogene* 39(14) (2020) 2934-2947.
- [74] Y. Oda, K. Kasakura, I. Fujigaki, A. Kageyama, K. Okumura, H. Ogawa, T. Yashiro, C. Nishiyama, The effect of PU.1 knockdown on gene expression and function of mast cells, *Sci Rep* 8(1) (2018) 2005.
- [75] G.M. Deng, V.C. Kytтарыs, G.C. Tsokos, Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases, *Front Immunol* 7 (2016) 78.

[76] D.G. Efremov, S. Turkalj, L. Laurenti, Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies, *Cancers (Basel)* 12(6) (2020).

## Discussion et perspectives

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle puissante de la régulation et de la signalisation cellulaires. Elle se produit au cours d'une réaction biochimique permettant le transfert d'un groupe phosphate d'une molécule donneuse, généralement l'ATP, à un substrat protéique sur des acides aminés, tels que les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Catalysé par les protéines kinases, cet événement crée une liaison covalente qui peut provoquer une modification structurale capable d'influencer la fonction de la protéine cible.

Avec plus de 32 sites accepteurs de phosphorylation [39], la protéine Syk est une cible de choix, dont la nature et le taux de phosphorylation sont déterminants dans de nombreuses pathologies [230]. Des modèles murins déficients en Syk ont mis en évidence son importance dans le développement de la souris [123]. L'étude du rôle des modifications post-traductionnelles par phosphorylation de Syk a mis à jour leurs implications majoritairement dans la régulation de son activité enzymatique en tant que kinase et minoritairement dans la régulation de sa capacité d'interaction avec d'autres protéines en tant que protéine adaptatrice.

Sachant que certains des acides aminés de Syk sont impliqués dans des modèles de son changement structural [45]; [38]; [37], nous avons émis l'hypothèse que leur phosphorylation pouvait être associée à des impacts fonctionnels différentiels grâce à des mécanismes de signalisation distincts (voir manuscrit 1). Pour répondre à cette hypothèse, l'objectif de ce travail de thèse a donc consisté à étudier comment l'expression de mutants de Syk pour ses sites de phosphorylation, qui sont impliqués dans sa fonction kinase ou sa fonction adaptatrice, jouait un rôle sur les réponses cellulaires. Notre modèle pathologique d'intérêt est la LLC pour lequel nos résultats démontrent que Syk est différenciellement phosphorylée entre deux groupes de patients dont la survie cellulaire en réponse à une stimulation du BCR est distincte. Les cellules leucémiques de ces deux catégories de patients montrent des profils d'électrophorèse en 2 dimensions de Syk qui sont différents ; diversité qui est retrouvée suite à l'hybridation avec des anticorps anti-phospho-Syk spécifiques. Au regard de la difficulté à faire exprimer des protéines exogènes dans des cellules primaires B de LLC qui sont connues pour être très hétérogènes sur le plan biologique, nous avons fait le choix d'utiliser une lignée B de LLC, les cellules HG3 [231], qui à notre connaissance est la seule lignée de LLC qui exprime le CD5, un marqueur caractéristique de la pathologie.

Nos travaux montrent que la surexpression de Syk sauvage entraîne une activation de la voie calcique par l'activation de la PLC $\gamma$ 2. Cette dernière est phosphorylée sur un résidu

tyrosine en position 759 par la kinase Syk qui conduit à une augmentation de son activité phospholipase [232]. La surexpression de Syk sauvage induit également une activation de la voie PI3K par l'activation du CD19. Ce dernier est corécepteur positif du BCR [233] qui est phosphorylé par Syk ou par les SFK [95]. Sur la base de ces résultats, nous avons généré des mutants de Syk ciblant des sites de phosphorylation connus pour avoir un rôle fonctionnel et nous avons étudié leur impact sur ces deux voies de signalisation. Dans les conditions basales, les résidus impliqués dans le processus d'activation du domaine catalytique de Syk contribuent positivement à l'activation des voies calcique et PI3K, comme le démontrent la diminution de l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et celle du CD19 observées dans les cellules B de LLC surexprimant les variants YY348/352FF et YY525/526FF par rapport à la forme sauvage. A l'inverse les résidus impliqués dans sa fonction adaptatrice ne semblent pas avoir d'impact sur la phosphorylation de ces deux effecteurs suite à la surexpression des formes mutées (Y323F et YYY629/630/631FFF) ; impact qui est équivalent à la forme non mutée de Syk.

Cette différence d'impact des mutants de Syk sur ces voies pourrait être liée à une différence de leur stabilité intracellulaire causée par une altération de leur fonction kinase. Cette hypothèse est corroborée par nos résultats biochimiques révélant une expression plus faible des mutants affectant le processus d'activation du domaine catalytique de Syk par rapport aux mutants touchant sa capacité à lier d'autres protéines. En effet, il a été montré que la substitution des résidus tyrosine dans l'inter-domaine B (348 et 352) et dans la boucle d'activation du domaine catalytique (525 et 526) par des résidus phénylalanine entraînent une diminution de l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et/ou de l'influx calcique [234]. En revanche, la substitution des résidus tyrosine 323 dans l'inter-domaine B et celle des résidus tyrosine 630 et 631 dans la partie Ct par des résidus phénylalanine a été décrite pour ne pas altérer leur activité kinase [235]; [236]. En effet, la phosphorylation des résidus tyrosine 323 et en Ct est décrite pour recruter des partenaires tels que Cbl et BLNK, respectivement [234]. Si la E3 ligase Cbl est impliquée dans la dégradation de Syk [237], la protéine d'échafaudage BLNK joue un rôle dans la constitution du signalosome du BCR [238], suggérant que l'absence d'interaction avec BLNK protège le mutant d'une éventuelle dégradation. Dans tous les cas, il serait intéressant de mesurer l'activité kinase de tous les mutants utilisés dans notre modèle B pathologique, qui exprime la protéine Syk de façon endogène. En effet, il n'est pas exclu que Syk endogène puisse participer à l'activation des mutants utilisés dans cette étude. La génération de cellules HG3 dont le gène *SYK* est la cible d'un système CRISPR/Cas9 est actuellement en cours dans

l'équipe et devrait permettre d'étudier plus finement l'impact de ces mutants de phosphorylation.

La différence d'impact des mutants de Syk sur ces voies pourrait être aussi associée au changement conformationnel de Syk qu'induisent leurs mutations. Selon le modèle proposé par les travaux de l'équipe de Grädler [45], un maintien de Syk, sous une forme inactive et non phosphorylée, passe par la mutation de ses résidus tyrosine 348 et 352. En effet, il a été montré que le résidu Y348 dans l'inter-domaine B forme une liaison hydrogène avec un résidu situé dans l'inter-domaine A. Sa phosphorylation perturberait ce contact et contribuerait au dépliement de Syk. De plus, le résidu Y352 est situé dans une cavité lipophile au sein de l'inter-domaine B et sa chaîne latérale est orientée vers divers acides aminés répartis le long de la séquence de Syk. La phosphorylation du résidu Y352 déstabiliserait la conformation de la boucle d'activation à l'interface du domaine kinase pour exposer les résidus Y525 et Y526. Il convient de noter que les deux résidus Y348 et Y352, qui sont équivalents aux résidus Y315 et Y319 de Zap-70, sont également essentiels à la stabilisation de la conformation auto-inhibée, bien qu'ils ne soient pas impliqués dans le même type d'interaction [53]; [45]. Quant aux résidus tyrosine 525 et 526, ils sont situés dans la boucle d'activation (520-534) du domaine catalytique et sont positionnés vers le site d'ATP. Dans la structure de la protéine Syk complète, le résidu Y525 est situé à une distance plus courte du groupe  $\gamma$ -phosphate d'un analogue de l'ATP que le résidu Y526, indiquant que le résidu Y525 serait préférentiellement phosphorylé [45]. Cependant, une étude biochimique antérieure a montré que le résidu Y526 est phosphorylé avant le résidu Y525 [39], pointant la complexité de la réaction de phosphorylation de Syk quand elle est exprimée dans les cellules B. Le résidu Y323 qui est situé dans l'inter-domaine B, et plus particulièrement la région comprenant les acides aminés 267 à 337, n'ont pu être modélisés dans la structure de la protéine Syk complète, suggérant que cette région de Syk est très flexible [45]. De façon intéressante, cette région comprend celle des 23 acides aminés qui est absente dans Syk S (283-305), dont la même fonction n'est pas la même que celle de Syk complète [30]. Ceci suggère que ce mutant ait préférentiellement une localisation nucléaire par rapport aux autres mutants, hypothèse qu'il serait intéressant de vérifier dans notre modèle cellulaire. Pour les résidus tyrosine en position 629, 630 et 631 situés dans la partie Ct, ils (Y630 et Y631) forment des liaisons hydrogènes avec des résidus localisés dans l'inter-domaine A, permettant de maintenir Syk dans un état replié et donc structurellement fermé. La phosphorylation de ces résidus en Ct romprait ces interactions et conduirait à une ouverture conformationnelle de Syk. Ces résultats sont en accord avec le plus grand niveau de

phosphorylation observé sur ce mutant [236], suggérant qu'il soit plus accessible à d'autres kinases intracellulaires, si son activité kinase n'est pas augmentée (voir ci-dessus). L'ensemble de ces données suggèrent que les doubles mutants de Syk (Y348/Y342 et Y525/526) soient dans un état transitionnel entre les conformations inactives et actives alors que le triple mutant (YYY629/630/631) serait dans un état conformationnel plus ouvert et actif.

De manière inattendue, la stimulation du BCR des cellules HG3 est incapable d'entraîner une augmentation de l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et ce, en absence ou en présence de surexpression de Syk. Cette absence d'activation du BCR suggère une limitation de la propagation du signal dans la voie calcique. A l'inverse, un engagement du BCR avec un anti-IgM pour les mêmes temps de stimulation des cellules HG3, sans surexpression de Syk, déclenche une phosphorylation du CD19 dès 2 min, qui est maintenue jusqu'à 10 min, et d'Akt dès 2 min et qui est maximale à 5 min, dans la voie PI3K. Nos résultats indiquent qu'une stimulation antigénique active principalement la voie de la PI3K dans les HG3. En revanche, la stimulation du BCR des cellules B de LLC surexprimant les différentes formes mutées de Syk tendent à montrer une diminution de l'activation du CD19.

Cette différence d'activation des deux voies peut être expliquée par l'expression de Zap-70, un homologue de Syk, dans les cellules HG3. En effet, les travaux de Sadras T [95] démontrent que lorsque Zap-70 est exprimé, il se substitue à Syk dans la voie calcique et interfère avec l'anergie et la sélection négative des cellules B résultant d'une stimulation chronique du BCR. L'étude des partenaires de Syk et Zap-70 révèle de nombreux interacteurs communs comme les protéines adaptatrices telles que Vav1, les phosphatases telles que PTPN6 et les protéines d'échafaudage telles que BLNK. Dans une lignée B du lymphome de Burkitt dépourvue de Syk, la co-expression de Syk et de Zap-70 réduit l'activation de plusieurs effecteurs de la voie calcique, tels que la PLC $\gamma$ 2, en réponse à une stimulation du BCR par rapport à des cellules exprimant seulement Syk. Parallèlement, Syk est déplacée vers la voie PI3K pour augmenter la phosphorylation du CD19 et d'Akt (activation oncogène de la voie de signalisation des BCR) et la multiplication cellulaire [95]. Si nos résultats sont en accord avec le modèle proposé par Sadras T concernant la voie calcique, ils ne corroborent pas ceux de la voie PI3K par la diminution de l'activation du CD19 et de Akt dans les cellules stimulées surexprimant Syk sauvage et les mutants de sa fonction adaptatrice.

Dans les conditions basales, nos données de l'analyse fonctionnelle montrent que la surexpression de Syk sauvage (WT) augmente l'activité métabolique et la capacité de sécrétion des cellules HG3 par rapport aux cellules transfectées avec un plasmide vide, indiquant que Syk

sauvage contribue positivement à ces deux réponses biologiques. A l'inverse, la forme déficiente de l'activité kinase de Syk (KD) agit comme un dominant négatif sur ces deux effets biologiques. Parmi les quatre variants de Syk, seuls les mutants YY348/352FF et YY525/526FF agissent comme des dominants négatifs sur l'activité métabolique des cellules leucémiques, pointant l'importance du processus d'activation du domaine catalytique de Syk dans cette réponse biologique. De façon intéressante, seul le triple mutant (YYY629/630/631FFF) de Syk agit comme un dominant positif de la capacité sécrétoire de l'IL8, du TNF $\alpha$  et de la CCL4 des cellules HG3, indiquant le rôle prépondérant de la fonction adaptatrice et de l'état conformationnel potentiellement « ouvert » de ce mutant de Syk dans cette fonction biologique des cellules leucémiques non stimulées. A notre connaissance, nos données sont les premières à montrer un impact biologique du triple mutant de Syk.

Un engagement du BCR des cellules leucémiques n'exprimant que le Syk endogène tend à augmenter, mais sans significativité, l'activité métabolique et la capacité de sécrétion des HG3, suggérant l'absence d'un ou plusieurs effecteurs positifs des voies de signalisation, voire leur présence avec des fonctions altérées, ou l'expression de facteurs négatifs. En revanche, la surexpression de Syk sauvage augmente la sensibilité des cellules à répondre à une stimulation antigénique en termes de métabolisme et de sécrétion. Cette levée du seuil de réponse à l'antigène par l'ajout de Syk exogène pourrait être expliquée par une compensation de la présence du virus Epstein-Bar (EBV) qui a été utilisé pour immortaliser les cellules d'un patient LLC et générer la lignée HG3 [239]. En effet, les cellules infectées par l'EBV expriment un large répertoire de gènes viraux tels que les antigènes nucléaires EBNA, les protéines membranaires LMPs et des microRNAs. Une étude récente portant sur la régulation de la signalisation du BCR par l'EBV montre que ce virus réprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans cette cascade tels que les composants du BCR lui-même, avec le *CD79A* et le *CD79B*, et des effecteurs en aval comme *BLNK* ou *NFAT2* [240]. De plus, la présence d'un ITAM dans *LMP2A* qui lie la SFK, Lyn, et Syk, suggère que *LMP2A* séquestre ces deux kinases et interfère avec leur activation par le BCR [241].

Pour mesurer la capacité de sécrétion des cellules HG3, les facteurs solubles ont été choisis en fonction de leurs effets immuno-régulateurs, tels que l'IL10 et les TGF $\beta$ , ou leurs effets pro-inflammatoires, comme l'IFN $\gamma$ , l'IL6, l'IL8, le TNF $\alpha$  ou la CCL4 [242]; [243]. Parmi tous les facteurs solubles quantifiés, seuls l'IL8, le TNF $\alpha$  et la CCL4 sont régulés par l'expression de Syk. L'IL8 (Interleukine 8) est l'une des premières cytokines dont le niveau d'expression est retrouvé élevé dans le sérum des patients LLC comparé à celui des sujets sains.



Son mode d'action repose sur un mécanisme d'autocrinie des cellules B pathologiques dont la survie augmente [244]. Le TNF $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ ) a été également identifié dans les sérums de patients LLC à des taux élevés qui sont indicatifs d'une maladie agressive, suggérant un rôle dans la progression de la LLC [245]. Le TNF- $\alpha$  agit aussi comme un facteur de croissance autocrine dans la LLC [246]. Quant à la CCL4 (ou MIP1 $\beta$ ), c'est une chimiokine retrouvée à de forts taux dans le plasma des patients LLC. Elle est sécrétée par les cellules B de LLC en réponse à une stimulation du BCR ou lorsqu'elles sont en co-culture avec des NLCs [243]. L'ensemble de ces facteurs permet la constitution d'un milieu inflammatoire favorable à la survie des cellules B de LLC [247] dans laquelle Syk jouerait un rôle en modulant la sécrétion de ces facteurs.

Il est à noter que la stimulation antigénique permet aux mutants YY348/352FF et YY525/526FF de conserver leur rôle en tant que dominants négatifs sur l'activité métabolique des HG3. En revanche, cette stimulation ne permet pas au triple mutant (YYY629/630/631FFF) de maintenir son rôle de dominant négatif sur la capacité sécrétoire. En effet, même si l'engagement du BCR permet une accumulation des 3 cytokines dans le milieu cellulaire surexprimant le triple mutant, il est équivalent à ceux mesurés dans les milieux des cellules HG3 surexprimant le mutant Y323F et Syk sauvage. La perte du rôle de dominant négatif du triple mutant sur la capacité à sécréter des cellules stimulées pourrait être expliquée par une diminution de l'activation du corécepteur du BCR, le CD19, et celle de l'effecteur Akt dans la voie PI3K suite à une stimulation.

L'ensemble de ce travail qui porte sur certaines phosphorylations de Syk et de leur impact fonctionnel dans une lignée B de LLC, nous permet d'apporter de nouveaux éléments sur le rôle de Syk comme promoteur de tumeur dans la LLC. Son rôle pro-tumoral est largement documenté dans diverses pathologies lymphoïdes et non-lymphoïdes [124]. Il repose principalement sur sa surexpression et son activation constitutive comme cela a été décrit dans les cellules B de LLC et d'autres hémopathies B [175] [169]. Il serait intéressant d'étudier si les mutants de Syk que nous avons générés ont les mêmes effets, en tant que dominants positif ou négatif, sur la survie et la capacité de sécrétion des autres modèles pathologiques. En ligne avec nos résultats sur le triple mutant, il est tentant de spéculer que Syk endogène, qui est plus phosphorylé dans les cellules B des patients répondeurs LLC soit dans un état conformationnel plus ouvert que celui de Syk qui est moins phosphorylé dans les cellules leucémiques des patients non répondeurs [175]. Un dosage de l'IL8, du TNF $\alpha$  et de la CCL4 dans les surnageants des cellules B des patients LLC répondeurs ou non-répondeurs devrait révéler une plus forte

sécrétion de ces trois facteurs dans le surnageant des patients répondeurs qui montrent une progression plus rapide de la maladie. Si le blocage des effets dominant négatifs des mutants de phosphorylation impliqués dans le processus d'activation du domaine catalytique de Syk peut être rapproché de celui d'un traitement avec des inhibiteurs de la kinase, tels que le R406 [124], l'interférence de l'effet dominant négatif causé par un changement conformationnel reste un véritable défi.

L'intérêt que j'ai porté au rôle de Syk en cancérogénèse a été initié par des travaux auxquels j'ai contribué et qui ont été publiés au cours de ma thèse (voir manuscrit 2). La tumorigénèse est associée à des dysfonctionnements de voies de signalisation impliquant notamment l'expression ectopique d'effecteurs tels que Vav1, Syk et  $\beta$ -caténine. Mes travaux portent sur l'étude de la capacité d'interaction de Syk avec ces effecteurs de signalisation et sur l'impact fonctionnel de ce partenariat dans la progression du cancer du poumon ; modèle pathologique dans lequel l'expression de Syk est peu documentée [216]. Mes travaux ont mis à jour l'existence d'un nouveau complexe fonctionnel entre Syk,  $\beta$ -caténine et Vav1 qui joue un rôle dans la migration de cellules tumorales. Ils ont aussi permis de montrer la régulation fonctionnelle de la  $\beta$ -caténine par la phosphorylation générée par Syk. Enfin, ils révèlent une nouvelle régulation transcriptionnelle du gène Syk par la voie  $\beta$ -caténine/TCF4.

Un des partenaires de Syk est la protéine Vav1, dont le niveau d'expression est corrélé avec celui de Syk dans des cellules de cancer du poumon [216], suggérant la phosphorylation des résidus tyrosine en position 604 et 844 de Vav1. Ces tyrosines sont prédites par l'analyse des sites potentiels de phosphorylation obtenus via Phosphonet comme cible potentiel de phosphorylation de la protéine Syk [216]. Malgré la démonstration d'un partenariat entre Vav1 et Syk, nous n'avons pu détecter ces phosphorylations de Vav1 dans le complexe. Il est possible que la phosphorylation de Vav1 dépende du niveau de phosphorylation globale ou de certains des résidus de Syk. Au regard des différents niveaux de phosphorylation et des probables activités kinases des variants de Syk que nous avons générés dans mon objectif principal de thèse, ces différents mutants constitueraient de bons outils pour étudier la modulation du partenariat entre Vav1 et Syk. En effet, le complexe protéique Syk/Vav1 contribue fonctionnellement à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses du poumon par l'activation des GTPases, telles que Rac1. Ces données corroborent d'autres travaux effectués sur un modèle de cancer pancréatique qui démontrent le rôle pro-tumoral de Vav1 par les GTPases Rac1 et Cdc42 [248] [249]. En revanche, ils sont différents de ceux décrits dans les cellules hématopoïétiques qui montrent que la fonction de Vav1 affecte préférentiellement les

GTPases Rac1 et RhoA [216]. Il serait donc intéressant d'étudier dans les cellules B de LLC l'impact des variants de Syk sur la capacité d'interaction entre Syk et Vav1 et sur la capacité de Vav1 à activer des GTPases, tout en analysant leur impact sur la capacité migratoire et la réorganisation du cytosquelette des cellules leucémiques. Ces études permettraient d'élargir la fonction des différents mutants, et notamment celle du triple mutant, et de les comparer entre deux modèles cancéreux dans lesquels Syk joue un rôle pro-tumoral.

Le lien pro-tumoral de Syk a été consolidé par la mise en évidence d'un complexe entre Syk, Vav1 et  $\beta$ -caténine. En effet, la phosphorylation par Syk de  $\beta$ -caténine, qui est facilitée par Vav1, résulte d'un renforcement du complexe protéique formé par ce trio et facilite la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Une fois dans le noyau, le complexe  $\beta$ -caténine/TCF4 se fixe directement sur le promoteur du gène Syk, établissant ainsi une boucle rétroactive de régulation entre Syk et  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses de poumon. Il est intéressant de noter que ces trois protéines sont exprimées dans les cellules B de LLC [175], [250] [251] et que la mise en place d'une telle boucle de régulation puisse exister. Au regard de l'implication des phosphorylations induites par Syk dans l'établissement de cette boucle, il serait intéressant de déterminer quel mutant de Syk est capable de réguler sa propre expression par le biais de la  $\beta$ -caténine, tout en étudiant la capacité des cellules B de LLC à adhérer aux cellules du microenvironnement qui favorise la survie des cellules leucémiques.

En conclusion, mon travail de thèse porte sur Syk, une protéine dotée d'un rôle pro-tumoral dans deux modèles pathologiques que sont les cellules cancéreuses B et pulmonaires. Il m'a permis de renforcer le lien existant entre les différentes réponses biologiques des cellules tumorales et les fonctions kinase et adaptatrice de Syk. L'analyse de ces fonctions de Syk par le biais de ses sites de phosphorylation m'a donné l'opportunité d'établir un modèle dans lequel l'état conformationnel de Syk a un impact différentiel sur les voies de signalisation et sur les réponses biologiques. En rajoutant le paramètre « changement conformationnel » à la description du mode d'action de Syk, mes travaux contribuent à une meilleure connaissance du lien structure-fonction de Syk, tout en ouvrant de nouvelles pistes d'investigation dans la tumorigenèse.

## Bibliographie

- [1] H. L. Zhanwu Hou, «Mapping the Protein Kinome: Current Strategy and Future Direction,» *Cells*, p. 925, 2023.
- [2] D. A. Walsh, «An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle,» *J Biol Chem*, p. 3763, 1968.
- [3] A. Pizzoni, «From Membrane to Nucleus: A Three-Wave Hypothesis of cAMP Signaling,» *J Biol Chem*, 2023.
- [4] D. R. Knighton, «Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase,» *Science*, p. 407, 1991.
- [5] A. C. Nairn, «Calcium/calmodulin-dependent protein kinases,» *Seminars in cancer biology*, pp. 295-303, 1994.
- [6] M. M. T. K. Yoshihiro Baba, «Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2,» *Molecular Immunology*, pp. 339-343, 2024.
- [7] Y. Takai, «A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1977.
- [8] Y. Takai, «Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids,» *J Biol Chem*, pp. 3692-5, 1979.
- [9] A. C. Newton, «Balanced, Protein Kinase C: Perfectly balanced,» *Rev Biochem Mol Biol*, pp. 208-230, 2018.
- [10] B. Su, «Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression,» *Curr Opin Immunol*, pp. 402-411, 1996.
- [11] H. Lavoie, «ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate,» *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 607-632, 2020.
- [12] A. G., «The Multifaceted Output of c-Jun Biological Activity: Focus at the Junction of CD8 T Cell Activation,» *Cells*, 2020.
- [13] A. Plotnikov, «The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation,» *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010.
- [14] A. J. Sadler, «Structure and function of the protein kinase R,» *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007.
- [15] M. J. Clemens, «The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function,» *J Interferon Cytokine Res*, 1997.
- [16] A. Venerando, «Casein kinase: the triple meaning of a misnomer,» *Biochem J*, 2014.
- [17] M. R. L. A. P. Andrea Venerando, «Casein kinase: the triple meaning of a misnomer,» *Biochem J*, pp. 141-56, 2014.
- [18] J. Schlessinger, «Cell signaling by receptor tyrosine kinases,» *Cell*, 2000.
- [19] M. K. Paul, «Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer,» *Int. J. med. Sci*, pp. 101-115, 2004.
- [20] T. Hunter, «Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling,» *Cell*, pp. 255-236, 1995.
- [21] P. W. Schenk, «Signal perception and transduction: the role of protein kinases,» *Biochim Biophys Acta*, 1999.

- [22] Ulrich Blank, «Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity,» *Immunol Rev*, pp. 232(1):59-71., 2009.
- [23] S. B. Mkaddem, «Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools,» *Front. Immunol.*, 2019.
- [24] R. E. Steele, «Appearance and disappearance of Syk family protein-tyrosine kinase genes during metazoan evolution,» *Gene*, pp. 91-97, 1999.
- [25] G. Ruvkun, «The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*,» *Science*, pp. 2033-2041, 1998.
- [26] T. A. Chan, «Identification of a gene encoding a novel protein-tyrosine kinase containing SH2 domains and ankyrin-like repeats,» *Oncogene*, pp. 1253-9, 1994.
- [27] Che-Leung Law, «Molecular Cloning of Human Syk,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, pp. 12310-12319, 1994.
- [28] Ku, «Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans.,» *Immunogenetics* , pp. 300-302, 1994.
- [29] L. Wang, «Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer,» *Cancer Res*, pp. 4724-4730, 2003.
- [30] S. Latour, «A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling,» *EMBO J*, pp. 2584-95, 1998.
- [31] S. Yanagi, «Syk expression and novel function in a wide variety of tissues,» *Biochem Biophys Res Commun*, pp. 495-8, 2001.
- [32] W. Lei, «Spleen tyrosine kinase (L) suppresses breast cancer development by downregulating the expression of cyclin D1, ID1, B-myb and Fra1,» *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, pp. 85-9, 2007.
- [33] F. Zhou, «Nucleocytoplasmic Trafficking of the Syk Protein Tyrosine Kinase,» *Mol Cell Biol*, p. 3478–3491, 2006.
- [34] P. K. Singh, «Biochemical characterization of spleen tyrosine kinase (SYK) isoforms in platelets,» *Platelets*, 2023.
- [35] B. Heizmann, «Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor,» *BIOLOGICAL SCIENCES*, pp. 18563-18568, 2010.
- [36] Y. Zhang, «Tyr130 phosphorylation triggers Syk release from antigen receptor by long-distance conformational uncoupling,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 11760-11765, 2008.
- [37] M. S. Mansueto, «A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism,» *J Biol Chem*, pp. 7658-7668, 2019.
- [38] M. Cottat, «Phosphorylation impact on Spleen Tyrosine kinase conformation by Surface Enhanced Raman Spectroscopy,» *Scientific Reports*, 2017.
- [39] Hanibal Bohnenberger, «Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells,» *Eur. J. Immunol.*, p. 41: 1550–1562, 2011.
- [40] Ulrich Grädler, «Structural and Biophysical Characterization of the Syk Activation Switch,» *Journal of Molecular Biology*, pp. Pages 309-333, 2013.
- [41] R. O. d. Castro, «Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond,» *J Signal Transduct*, 2011.
- [42] K. D. Moon, «Molecular Basis for a Direct Interaction between the Syk Protein-tyrosine Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, p. 1543–1551, 2005.

- [43] M. Deckert, «Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product,» *Immunity*, pp. 591-604, 1996.
- [44] M. Furlong, «Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine proteintyrosine kinase Syk,» *Biochim Biophys Acta*, pp. 177-190, 1997.
- [45] U. Grädler, «Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch,» *J Mol Biol*, pp. 309-33, 2013.
- [46] T Kurosaki, «Role of the Syk authophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling,» *J Exp Med*, p. 1815–1823., 1996.
- [47] L. Zeitlmann, «T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70,» *The Journal of biological chemistry*, pp. 15445-15452, 1998.
- [48] Y. Kulathu, «The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development,» *The EMBO Journal*, pp. 1333-1344, 2008.
- [49] N Rao, «The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation,» *EMBO J.*, pp. 20(24):7085-95. , 2001.
- [50] Henry, «SYK ubiquitination by CBL E3 ligases restrains cross-presentation of dead cell-associated antigens by type 1 dendritic cells,» *Cells reports*, p. 42, 2023.
- [51] Dangelmaier, «Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in platelets,» *HEMOSTASIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY*, 2005.
- [52] Ernesto Arias-Palomo, «3D structure of Syk kinase determined by single particle electron microscopy,» *Biochim Biophys Acta.* , p. 1774(12): 1493–1499., 2007.
- [53] Sebastian Deindl, «Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70,» *Cell.*, pp. 129(4):735-46., 2007.
- [54] Qingrong Yan, «Structural Basis for Activation of ZAP-70 by Phosphorylation of the SH2-Kinase Linker,» *Mol Cell Biol.*, p. 33(11): 2188–2201, 2013.
- [55] Ernesto Arias-Palomo, «Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation,» *Biochim Biophys Acta*, pp. 1794(8):1211-7., 2009.
- [56] TQingrong Yan, «Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker,» *Mol Cell Biol*, pp. 33(11):2188-201, 2013.
- [57] Helen T. Hobbs, «Differences in the dynamics of the tandem-SH2 modules of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinases,» *Protein Sci.*, pp. p. 2373-2384, 2021.
- [58] Rodrigo O. de Castro, «Tyrosines in the Carboxyl Terminus Regulate Syk Kinase activity and function,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, p. 26674 – 26684, 2010.
- [59] M. Turner, «Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk,» *LETTERS TO NATURE*, 1995.
- [60] A. M. Cheng, «Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development,» *letters to nature*, 1995.
- [61] STEVEN K. HANKS, «The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains,» *SCIENCE*, 1988.
- [62] F. Abtahian, «Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk,» *Science* , pp. 247-51, 2003.
- [63] M. Kondo, «Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors,» *Immunol Rev.*, p. 238(1): 37–46., 2010.

- [64] Sean C. Bendall, «Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B Cell Development,» *Cell*, pp. 157, 714–725, 2014.
- [65] Fugmann, «The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition,» *Annu Rev Immunol*, pp. 18:495-527, 2000:.
- [66] Craig D Milne, «IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis,» *Semin Immunol*, pp. 18(1):20-30. , 2006.
- [67] Inga-Lill Mårtensson, «The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion,» *Semin Immunol*, pp. 335-42. , 2002.
- [68] Inga-Lill Mårtensson, «The pre-B cell receptor checkpoint,» *FEBS Lett*, pp. 2572-2579, 2010.
- [69] Kaoru Saijo, «Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development,» *Nat Immunol*, pp. 4(3):274-9., 2003.
- [70] Farnaz Fallah-Arani Dr., «Redundant role for Zap70 in B cell development and activation,» *Eur. J. Immunol.*, pp. 1721-1733, 2008.
- [71] Edina Schweighoffer 1, «Unexpected Requirement for ZAP-70 in Pre-B Cell Development and Allelic Exclusion,» *Immunity*, pp. Pages 523-533, 2003.
- [72] Fabian Köhler, «Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells,» *Immunity*, pp. 29(6):912-21., 2008.
- [73] Mathew J Parker, «The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription,» *EMBO J*, pp. 24(22):3895-905., 2005.
- [74] Kathrin Pieper, «B-cell biology and development,» *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, pp. VOLUME 131, NUMBER 959-971, 2013.
- [75] D. Nemazee, «Mechanisms of central tolerance for B cells,» *Nature Reviews Immunology*, p. 281–294 , 2017.
- [76] Mark R. Boothby, «Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity,» *Genes Dev*, pp. 33(1-2): 26–48., 2019.
- [77] Cerutti A, «Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes,» *Nat Rev Immunol* , p. 13: 118–132., 2013..
- [78] Dalla-Favera, «Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy,» *Nature Reviews Immunology*, pp. 8, pages22–33, 2008.
- [79] Janet Stavnezer, «Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination,» *Annu Rev Immunol.*, p. 26: 261–292., 2008; .
- [80] Clara Young, «The unique biology of germinal center B cells,» *Immunity*, p. 54, 2021.
- [81] M. Brüggemann, «Genes encoding the immunoglobulin constant regions,» *New Comprehensive Biochemistry*, pp. 51-80, 1987.
- [82] B. Treanor, «B-cell receptor: from resting state to activate,» *Immunology*, p. 136(1): 21–27., 2012.
- [83] James Hagman, «B Lymphocyte Lineage Specification, Commitment and Epigenetic Control of Transcription by Early B Cell Factor 1,» *Curr Top Microbiol Immunol.*, p. 356:17–38. , 2012.
- [84] Shinya Tanaka, «B Cell Receptor Signaling,» *Adv Exp Med Biol*, pp. 1254:23-36., 2020.
- [85] Alexey Ferapontov, «Antigen footprint governs activation of the B cell receptor,» *Nature Communications*, p. 14:976, 2023.

- [86] Sarah A. Shelby, «Membrane phase separation drives responsive assembly of receptor signaling domains,» *Nature Chemical Biology* volume, pp. 19, pages 750–758, 2023.
- [87] H. N. a. E. A. Clark, «REGULATION OF B-CELL FATE BY ANTIGEN-RECEPTOR SIGNALS,» *NATURE REVIEWS / IMMUNOLOGY*, 2002.
- [88] Sayak Mukherjee, «Monovalent and Multivalent Ligation of the B Cell Receptor Exhibit Differential Dependence upon Syk and Src Family Kinases,» *Sci Signal*, p. 6(256)., 2013.
- [89] P. Strzyz, «Tuning BCR signalling at lipid rafts,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, p. 380, 2023.
- [90] T. & H. M. Kurosaki, «Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes,» *Immunol Rev*, pp. 228, 132-148, 2009.
- [91] V. e. a. Rolli, «Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop,» *Mol Cell*, p. 1057–1069, 2002.
- [92] Stefan Feske, «Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. Nat Rev Immunol,» *Nat Rev Immunol*, pp. 532-547, 2012.
- [93] Cheng, «Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease,» *Crit Rev Immunol.*, p. 32(1): 23–63., 2012.
- [94] Harry W. Schroeder Jr., «4-Antigen Receptor Genes, Gene Products, and Coreceptors,» chez *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, Elsevier, 2019, pp. Pages 55-77.e1.
- [95] Teresa Sadras, «Developmental partitioning of SYK and ZAP70 prevents autoimmunity and cancer,» *Molecular Cell*, pp. 81, 2094–2111, 2021.
- [96] Wei Luo, «vThe AKT kinase signaling network is rewired by PTEN to control proximal BCR signaling in germinal center B cells,» *Nat Immunol.*, p. 20(6): 736–746., 2019.
- [97] Werner, «Role of PI3K in the generation and survival of B cells,» *Immunol Rev*, pp. 237, 55-71, 2010.
- [98] David H, «The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development,» *Immunologicoi Revjews*, pp. 165:167-180, 1998.
- [99] Weiss, «Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development,» *JEM.*, pp. 1703-1715, 2007.
- [100] Ariadne L Hager-Theodorides, «β-Selection: Abundance of TCRβ–/γδ– CD44–CD25– (DN4) cells in the foetal thymus,» *Eur J Immunol.*, p. 37(2): 487–500, 2007.
- [101] A. Iwasaki, 2020. [En ligne]. Available: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f4fb5aeb62abd34c2297008-tcr-downstream-signaling>.
- [102] Nichola Cooper, «Recent advances in understanding spleen tyrosine kinase (SYK) in human biology and disease, with a focus on fostamatinib,» *Platelets*, p. 34(1): 1–13, 2023.
- [103] D. Mancardi, «Fc Receptors in Immune Responses,» *Elsevier Inc*, 2014.
- [104] Gringhuis, «Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses,» *Nature Reviews Immunology*, pp. 9, pages 465–479, 2009.
- [105] J. Zhang, «Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells,» *J Exp Med*, pp. 71-79, 1996.
- [106] P. S. Costello, «Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells,» *Oncogene*, pp. 2595-2605., 1996.



- [107] Z. K. Indik, «The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis,» *Blood*, pp. 4389-4399, 1995.
- [108] S. Greenberg, «Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 1103-1107, 1996.
- [109] F. Kiefer, «The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils,» *Mol Cell Biol*, pp. 4209-20, 1998.
- [110] Christine C. Winterbourn, «Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function,» *Annual Review of Biochemistry*, pp. Vol. 85:765-792, 2016.
- [111] A. Mócsai, «Syk is required for integrin signaling in neutrophils,» *Immunity*, pp. 547-58, 2002.
- [112] A. Mócsai, «Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs,» *Nature Immunology*, p. 1326–1333, 2006.
- [113] Pankaj Kumar Singh, «Biochemical characterization of spleen tyrosine kinase (SYK) isoforms in platelets,» *Platelets*, p. 2023; 34(1): 1–7, 2023.
- [114] Wang, «G(s)alpha repression of adipogenesis via Syk,» *J Biol Chem*, pp. 274(45):32159-66. , 1999.
- [115] T Yamada, «Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production,» *J Immunol*, pp. 166(1):538-43., 2001.
- [116] Marina Ulanova, «Syk tyrosine kinase participates in  $\beta$ 1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells,» *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. 288: L497–L507., 2005.
- [117] P J Coopman, «The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells,» *Nature*, pp. 406(6797):742-7., 2000.
- [118] Bo-Ram Bang, «The protein tyrosine kinase SYK regulates the alternative p38 activation in liver during acute liver inflammation,» *Scientific Reports*, p. 17838, 2019.
- [119] Shigeru Yanagi, «Syk Expression and Novel Function in a Wide Variety of Tissues,» *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, pp. 495-498, 2001.
- [120] Eric Hatterer, «Syk kinase is phosphorylated in specific areas of the developing nervous system,» *Neurosci Res*, pp. 70(2):172-82. , 2011.
- [121] A. Mocsai, «The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase.,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 101,6158-6163, 2004.
- [122] D. Csete, «Hematopoietic or Osteoclast-Specific Deletion of Syk Leads to Increased Bone Mass in Experimental Mice,» *Front Immunol*, p. 10: 937., 2019.
- [123] I. Aksentjevich, «The sickening consequences of too much SYK signaling,» *IMMUNE DYSREGULATION*, p. 426–434, 2021.
- [124] Krisenko, «Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer,» *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 254–263, 2015.
- [125] Buchner, «Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic,» *Cancer research*, pp. 69, 5424-5432, 2009.
- [126] Chen, «ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia.,» *Blood*, pp. 111, 2685-2692, 2008.

- [127] Gobessi, «Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells,» *Leukemia*, pp. (4):686-97., 2009.
- [128] Linfeng Chen, «SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma,» *Blood*, pp. 111(4):2230-7. , 2008.
- [129] Cheng, « SYK inhibition and response prediction in diffuse large B-cell lymphoma,» *Blood*, p. 6342–6352., 2011.
- [130] Chen, «SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT- dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas,» *Cancer Cell*, pp. 23(6):826-38., 2013.
- [131] Leseux, «Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells,» *Blood*, p. 108;4156–4162., 2006.
- [132] Andrea Rinaldi, «Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma,» *Br J Haematol*, pp. 132(3):303-16. , 2006.
- [133] Elena Ruiz-Ballesteros, «Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis,» *Blood*, pp. 106(5):1831-8, 2006.
- [134] Perova, «, Therapeutic potential of spleen tyrosine kinase inhibition for treating high-risk precursor B cell acute lymphoblastic leukemia,» *Sci. Transl. Me*, p. 236ra62., 2014.
- [135] Uckun, «, Targeting SYK kinase-dependent anti-apoptotic resistance pathway in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells with a potent SYK inhibitory pentapeptide mimic,» *Br. J. Haematol*, p. 149;508–517, 2010.
- [136] Uckun, «Nanoscale liposomal formulation of a SYK P-site inhibitor against B-precursor leukemia,» *Blood*, p. 121;4348–4354., 2013.
- [137] Feldman, «Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas,» *Leukemia*, p. 1139–1143., 2008.
- [138] Pechloff, «The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma,» *J. Exp. Med*, p. 207;1031–1044, 2010.
- [139] Olivia Hatton, «Syk Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Prevents HtrA2-dependent Loss of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) to Promote Survival of Epstein-Barr Virus+ (EBV+) B Cell Lymphomas,» *Journal of Biological Chemistry*, pp. 37368-37378, 2011.
- [140] Cynthia K. Hahn, «Proteomic and Genetic Approaches Identify Syk as an AML Target,» *Cancer Cell*, pp. Pages 281-294, 2009.
- [141] Peter G. Miller, «In Vivo RNAi Screening Identifies a Leukemia-Specific Dependence on Integrin Beta 3 Signaling,» *Cancer Cell*, pp. 45-58, 2013.
- [142] Thomas Oellerich, « $\beta$ 2 integrin-derived signals induce cell survival and proliferation of AML blasts by activating a Syk/STAT signaling axis,» *Blood*, pp. 3889-3899, 2013.
- [143] Bach, «Premature terminal differentiation protects from deregulated lymphocyte activation by ITK-Syk,» *J. Immunol.*, p. 024–1033., 2014.
- [144] Lu, «Syk tyrosine kinase mediates Epstein–Barr virus latent membrane protein 2A-induced cell migration in epithelial cells,» *J. Biol. Chem*, p. 8806–8814., 2006.

- [145] Fotheringham, «Epstein–Barr virus latent membrane protein-2A induces ITAM/Syk- and Akt-dependent epithelial migration through  $\alpha$ V-integrin membrane translocation,» *J. Virol*, p. 10308–10320, 2012.
- [146] Anurag Singh, «A Gene Expression Signature Associated with “K-Ras Addiction” Reveals Regulators of EMT and Tumor Cell Survival,» *Cancer Cell*, pp. Pages 489-500, 2009.
- [147] Lowe, «Intrinsic tumour suppression,» *Nature*, p. 307–315, 2004.
- [148] Jinghui Zhang, «A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses,» *Nature*, p. 481;329–334, 2012.
- [149] Prinos, «Alternative splicing of SYK regulates mitosis and cell survival,» *Nat. Struct. Mol. Biol.* , pp. 18, 673–679, 2011.
- [150] Udyavar, «Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer,» *BMC Syst. Biol.*, p. (Suppl. 5) (2013) S1., 2013.
- [151] Jose J. Limon, «Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation,» *Sec. B Cell Biology*, p. 3;228, 2012.
- [152] Srinivasan, «PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival,» *Cell*, pp. 139, 573-586., 2009.
- [153] Longo, «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* , pp. 111, 846-855., 2009.
- [154] Inuzuka, «Mcl-1 ubiquitination and destruction.,» *Oncotarget*, pp. 239-244, 2011.
- [155] D Baudot, «The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKC $\delta$  and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression,» *Oncogene*, p. 3261–3273, 2009.
- [156] Zhang, «A Novel Retinoblastoma Therapy from Genomic and Epigenetic Analyses,» *Nature* , pp. 481, 329-334., 2012.
- [157] Y Mamane, «mTOR, translation initiation and cancer,» *Oncogene* , pp. 25, pages6416–6422, 2006.
- [158] Murugan, «mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance,» *Seminars in Cancer Biology*, pp. 92-111, 2019.
- [159] J Carnevale, «SYK regulates mTOR signaling in AML,» *Leukemia*, pp. 27(11):2118-28., 2013.
- [160] Michael J. Duffy, «MYC as a target for cancer treatment,» *Cancer Treatment Reviews*, p. 102154, 2021.
- [161] Psathas, «The Myc-miR-17-92 axis amplifies B-cell receptor signaling via inhibition of ITIM proteins: a novel lymphomagenic feed-forward loop.,» *Blood*, pp. 122, 4220-4229, 2013.
- [162] L. Nitschke, «The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation.,» *Curr Opin Immunol* , pp. 17, 290-297, 2005.
- [163] Fiorella Tonello, «Nucleolin: a cell portal for viruses, bacteria, and toxins,» *Cell Mol Life Sci*, p. 3;79(5):271, 2022.
- [164] Wen-Horng Wang, «Syk Interacts with and Phosphorylates Nucleolin To Stabilize Bcl-xL mRNA and Promote Cell Survival,» *Mol Cell Biol.* , p. 34(20): 3788–3799., 2014.

- [165] Jove, «The STATs of cancer — new molecular targets come of age,» *Nature Reviews Cancer*, pp. 4, pages97–105, 2004.
- [166] R. Dalla-Favera, «The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia,» *Nature Reviews Cancer*, pp. 16, pages145–162, 2016.
- [167] Yair Herishanu, «The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia,» *Blood*, pp. 117(2):563-74., 2011.
- [168] Thomas M Herndon, «Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood,» *Leukemia*, pp. (6):1340-1347., 2017.
- [169] Dimitar G. Efremov, «Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies,» *Cancer*, p. 1396, 2020.
- [170] Michael Hallek, «Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures,» *ANNUAL CLINICAL UPDATES IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES*, pp. p. 1679-1705, 2021.
- [171] Bradley T Messmer, «Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia,» *J Exp Med*, pp. 200(4):519-25., 2004.
- [172] Marcus Dühren-von Minden, «Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling,» *Nature*, pp. 489(7415):309-12., 2012.
- [173] Etienne Leveille, «SYK and ZAP70 kinases in autoimmunity and lymphoid malignancies,» *Cell Signal*, p. 94:110331., 2022.
- [174] Cédric Schleiss, «BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation ex vivo,» *Sci Rep.*, p. 9: 701., 2019.
- [175] Christine Le Roy, «The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia,» *Blood*, pp. 356-365, 2012.
- [176] Pablo G Longo, «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*, pp. 111(2):846-55., 2008.
- [177] Aleksandar Petlickovski, «Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells,» *Blood*, pp. 105(12):4820-7., 2005.
- [178] Laura Carsetti, «Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation,» *Cell Signal*, pp. 21(7):1187-94. , 2009.
- [179] Linfeng Chen, «SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma,» *Blood*, pp. 2230-2237, 2008.
- [180] Shuhua Cheng, «SYK inhibition and response prediction in diffuse large B-cell lymphoma,» *Blood*, pp. 6342-6352, 2011.
- [181] Przemyslaw Juszczynski, «BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROt,» *Blood*, pp. 5315-5321, 2009.
- [182] Jonathan W. Friedberg, «Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia,» *Blood*, vol. 115, n° %113, p. 2578–2585., 2010.

- [183] Jonathan M. Irish, «Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells,» *Blood*, pp. 3135-3142, 2006.
- [184] Mark Merchant, «The LMP2A ITAM Is Essential for Providing B Cells with Development and Survival Signals In Vivo,» *J Virol.* , p. 74(19): 9115–9124., 2000.
- [185] Robert G Caldwell, «Epstein-Barr Virus LMP2A Drives B Cell Development and Survival in the Absence of Normal B Cell Receptor Signals,» *Immunity*, pp. 405-411, 1998.
- [186] Rares Drula, «Exploiting the ubiquitin system in myeloid malignancies. From basic research to drug discovery in MDS and AML,» *Blood Reviews*, p. 100971, 2022.
- [187] Elad Katz, «MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture,» *Journal of Experimental Medicine*, p. 201 (3): 431–439., 2005.
- [188] Zbigniew Wyżewski, «Virus-Mediated Inhibition of Apoptosis in the Context of EBV-Associated Diseases: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives,» *Int J Mol Sci.* , p. 23(13): 7265., 2022.
- [189] E Katz, «A gene on the HER2 amplicon, C35, is an oncogene in breast cancer whose actions are prevented by inhibition of Syk,» *Br J Cancer.* , p. 103(3): 401–410., 2010.
- [190] Narmeen N. Fathi, «Translocation-generated ITK-FER and ITK-SYK fusions induce STAT3 phosphorylation and CD69 expression,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. Pages 749-752, 2018.
- [191] Yoshie Kuno, «Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12),» *Blood*, p. 97 (4): 1050–1055., 2001.
- [192] C Sprissler, «Depletion of STAT5 blocks TEL-SYK-induced APMF-type leukemia with myelofibrosis and myelodysplasia in mice,» *Blood Cancer J*, p. 4(8):e240. , 2014.
- [193] Lin Wang, «Gain-of-function variants in SYK cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice,» *Nature Genetics*, p. 500–510, 2021.
- [194] J. R. Brown, «Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia,» *Expert Rev Hematol.*, p. 1(1): 51–61., 2008.
- [195] Angela Philippen, «SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL),» *British Journal of Haematology*, pp. 150, 618–641, 2010.
- [196] Goodman, «Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia,» *Oncogene*, pp. 20(30):3969-78, 2001.
- [197] Jan Blancato, «SYK Allelic Loss and the Role of Syk-Regulated Genes in Breast Cancer Survival,» *PLoS One* 9, p. e87610, 2014.
- [198] Moroni, «Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells,» *Cancer*, p. 7346–7354, 2004.
- [199] Tracy Layton, «Syk Tyrosine Kinase Acts as a Pancreatic Adenocarcinoma Tumor Suppressor by Regulating Cellular Growth and Invasion,» *The American Journal of Pathology*, pp. Pages 2625-2636, 2009.
- [200] You Me Sung, «Tumor Suppressor Function of Syk in Human MCF10A In Vitro and Normal Mouse Mammary Epithelium In Vivo,» *PLoS One*, p. e7445, 2009.
- [201] Toyama, «Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer,» *Cancer Lett*, p. 97–102., 2003.

- [202] Kunze, «Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas,» *Int. J. Mol. Med*, p. 547–557, 2006.
- [203] Yang, «Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer.,» *Med Oncol*, pp. 30, 586., 2013.
- [204] Bailet O., «Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest,» *Cancer research*, pp. 69;2748-2756., 2009.
- [205] Christoph Hoeller, «The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells,» *J Invest Dermatol*, pp. 124(6):1293-9, 2005.
- [206] Viswanathan Muthusamy, «Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma,» *Cancer Res*, pp. 66(23):11187-93, 2006.
- [207] Nakashima, «Clinical significance of nuclear expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in gastric cancer.,» *Cancer Lett*, pp. 236;89-94., 2006.
- [208] Wang, «Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma.,» *World J Gastroenterol*, pp. 1815-1818., 2004.
- [209] Jin, «5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell.,» *Gene*, pp. 511;224-226., 2012.
- [210] Yuan, «Frequent epigenetic inactivation of spleen tyrosine kinase gene in human hepatocellular carcinoma.,» *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, pp. 12;6687-6695., 2006.
- [211] Jian Hong, «CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma,» *J Clin Invest.* , p. 122(6): 2165–2175., 2012.
- [212] Kalluri, «The basics of epithelial–mesenchymal transition.,» *J. Clin.Invest.*, pp. 119 ,1440-1428, 2009.
- [213] Joseph H. Taube, «Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes,» *BIOLOGICAL SCIENCES*, pp. 107 (35) 15449-15454, 2010.
- [214] Zhang, «A role for the protein-tyrosine kinase, Syk, in regulating cell–cell adhesion and motility in breast cancer cells,» *Mol. Cancer*, p. 634–644., 2009.
- [215] Tracy Layton, «Syk Tyrosine Kinase Acts as a Pancreatic Adenocarcinoma Tumor Suppressor by Regulating Cellular Growth and Invasion.,» *The American Journal of Pathology*, pp. 2625-2636, 2009.
- [216] Rofia Boudria, «Regulatory interplay between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells,» *Cell Signal*, pp. 86, 110079, 2021.
- [217] Toufic Kassouf, «The Syk Kinase Promotes Mammary Epithelial Integrity and Inhibits Breast Cancer Invasion by Stabilizing the E-Cadherin/Catenin Complex,» *Cancer*, p. 11(12):1974., 2019.
- [218] Suhu Liu, «Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling,» *Pigment Cell Melanoma Res*, pp. 21(5):545-58, 2008.
- [219] Bailet, «Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest,» *Cancer research*, pp. 69, 2748-2756., 2009.

- [220] Lei Wang, «Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer,» *Cancer Res*, pp. 63(15):4724-30., 2003.
- [221] Hong, « Expression of variant isoforms of the tyrosine kinase SYK determines the prognosis of hepatocellular carcinoma,» *Cancer Res.* , pp. 74, 1845–1856. , 2014.
- [222] Wang, «Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression,» *Cancer Res.*, pp. pp. 10289-10297, 2005.
- [223] R. Orlandini de Castro, «Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond,» *J Signal Transduct*, p. 2011:507291, 2011.
- [224] Christine Le Roy, «The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia,» *Blood*, p. 356–365., 2012.
- [225] Pierre-Antoine Deglesne, «Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression,» *Cancer Res*, pp. 66(14):7158-66. , 2006.
- [226] Bustelo, «Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view,» *Small GTPases*, p. e973757 , 2014.
- [227] Attila Mócsai, «The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions,» *Nature Reviews Immunology*, p. 387–402 (2010), 2010.
- [228] S. Katzav, «Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein – good for the hematopoietic system, bad for cancer,» *Oncotarget.*, p. 6(30): 28731–28742., 2015.
- [229] Kelsey A Carpenter, «Wnt regulation of hematopoietic stem cell development and disease,» *Curr Top Dev Biol*, pp. 153:255-279. , 2023.
- [230] Vaclav Seda, «B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells,» *European Journal of Haematology* , p. 94 (193–205), 2014.
- [231] DSMZ, «Collection,» 2024. [En ligne]. Available: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-765>.
- [232] Jacob T. Jackson, «The role of PLC $\gamma$ 2 in immunological disorders, cancer, and neurodegeneration,» *J. Biol. Chem.*, p. 297(2) 100905, 2021.
- [233] Yuekang Xu, «CD19 differentially regulates BCR signalling through the recruitment of PI3K,» *Autoimmunity*, pp. 47(7):430-7., 2014.
- [234] Geahlen, «Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor,» *Biochim Biophys Acta*, p. 1793(7):1115–1127, 2009.
- [235] Mansueto, «A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism,» *J Biol Chem.* , p. 294(19): 7658–7668., 2019.
- [236] Rodrigo O. de Castro, «Tyrosines in the Carboxyl Terminus Regulate Syk Kinase Activity and Function,» *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, pp. 285, NO. 34, pp. 26674 –26684, 2010.
- [237] Navin Rao, «The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation,» *EMBO J.*, p. 20(24): 7085–7095., 2001.
- [238] RAJITA PAPPU, «Requirement for B Cell Linker Protein (BLNK) in B Cell Development,» *Science*, pp. pp. 1949-1954, 1999.
- [239] Anders Rosén, «Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection,» *Oncoimmunologie*, p. 1(1): 18–27., 2012.

- [240] Sarika Khasnis, «Regulation of B cell receptor signalling by Epstein-Barr virus nuclear antigens,» *Biochem J*, pp. 479(23):2395-2417., 2022.
- [241] C L Miller, «Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases,» *Immunity*, pp. 2(2):155-66. , 1995.
- [242] Arsène Mékinian, «Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression,» *Cancer Gene Therapy*, p. 30:1018 – 1028, 2023.
- [243] Jan A Burger, «High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation,» *Blood*, pp. 113(13):3050-8., 2009.
- [244] Denise Risnik, «Revisiting the role of interleukin-8 in chronic lymphocytic leukemia,» *Sci Rep.* , p. 7: 15714., 2017.
- [245] Alessandra Ferrajoli, «The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia,» *Blood*, pp. 100(4):1215-9., 2002.
- [246] W Digel, «High levels of circulating soluble receptors for tumor necrosis factor in hairy cell leukemia and type B chronic lymphocytic leukemia.,» *The Journal Of Clinical Investigation* , pp. 889(5):1690-1693., 1992.
- [247] Alexander F Vom Stein, «Role of the tumor microenvironment in CLL pathogenesis,» *Semin Hematol*, pp. S0037-1963(23)00098-7. , 2023.
- [248] Gina L Razidlo, «Targeting Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibition of Vav1, a Driver of Tumor Cell Invasion,» *Cancer Res*, pp. 75(14):2907-15., 2015.
- [249] Gina L Razidlo, «Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly,» *Curr Biol*, pp. 24(1):86-93. , 2014.
- [250] Rosario M Prieto-Sánchez, «Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q,» *Br J Haematol*, pp. 133(6):642-5, 2006.
- [251] Imane Mihoub, «Identification of the Axis  $\beta$ -Catenin–BTK in the Dynamic Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Their Microenvironment,» *Int. J. Mol. Sci.*, pp. 24(24), 17623, 2023.
- [252] T. Okada, «BCAP: The Tyrosine Kinase Substrate that Connects B Cell Receptor to Phosphoinositide 3-Kinase Activation,» *Immunity*, 2000.
- [253] K. Okkenhaug, «PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL),» *Curr Top Microbiol Immunol.* , p. 123–142., 2016.
- [254] M. A. Yasuda T, «Yasuda T, Maeda A, Kurosaki M, et al. Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding.,» *J exp Med* 2000, p. 641–650, 2000.
- [255] D. A. Law, «Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphallbbeta3 signaling in platelets,» *Blood*, pp. 93, 2645-2652., 1999.
- [256] «BASIC ANTIBODY STRUCTURE,» [En ligne]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/antibody-basics>.
- [258] Eric Davis, «Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma,» *Nature*, p. 88–92, 2010.



[259] Zichang Xu, «Advances in antibody discovery from human BCR repertoires,»  
*Frontiers in Bioinformatics*, 2022.