

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**L'importance de la coopération de TRAF1 et LSP1 en aval du récepteur
4-1BB(CD137) pour la survie des lymphocytes**

par

Daniela Ivanova-Andreeva

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtenir du grade de
M.Sc en Microbiologie et Immunologie
Novembre 2015

© *Daniela Ivanova-Andreeva, 2015*

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**L'importance de la coopération de TRAF1 et LSP1 en aval du récepteur
4-1BB(CD137) pour la survie des lymphocytes**

Présenté par :

Daniela Ivanova-Andreeva

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Sébastien Delisle, président-rapporteur

Dr. Laurent Sabbagh, directeur de recherche

Dr. Walid Mourad, membre de jury

RÉSUMÉ

4-1BB (CD137) est un membre de la superfamille TNFR qui est impliqué dans la transmission des signaux de survie aux lymphocytes. TRAF1 est une protéine adaptatrice qui est recrutée par 4-1BB et autres TNFRs et est caractérisée par une expression très restreinte aux lymphocytes, cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales. TRAF1 est nécessaire pour l'expansion et la survie des cellules T mémoire en présence d'agonistes anti-4-1BB *in vivo*. De plus, TRAF1 est requise en aval de 4-1BB pour activer (phosphoryler) la MAP kinase Erk impliquée dans la régulation de la molécule pro-apoptotique Bim. Suite à l'activation du récepteur 4-1BB, TRAF1 et ERK sont impliqués dans la phosphorylation de Bim et la modulation de son expression. L'activation et la régulation de TRAF1 et Bim ont un rôle important dans la survie des cellules T CD8 mémoires. Dans cette étude, nous avons utilisé une approche protéomique afin de pouvoir identifier de nouveaux partenaires de liaison de TRAF1. Utilisant cette stratégie, nous avons identifié que LSP1 (Leukocyte Specific Protein 1) est recruté dans le complexe de signalisation 4-1BB de manière TRAF1 dépendante. Une caractérisation plus poussée de l'interaction entre TRAF1 et LSP1 a montré que LSP1 lie la région unique N-terminal de TRAF1 de façon indépendante de la région conservée C-terminal. À l'instar des cellules T déficientes en TRAF1, les cellules T déficientes en LSP1 ne sont pas capables d'activer ERK en aval de 4-1BB et par conséquent ne peuvent pas réguler Bim. Ainsi, TRAF1 et LSP1 coopèrent en aval de 4-1BB dans le but d'activer ERK et réguler en aval les niveaux de Bim dans les cellules T CD8. Selon la littérature, le récepteur 4-1BB n'est pas exprimé à la surface des cellules B murines, mais le récepteur 4-1BB favorise la prolifération et la survie des cellules B humaines. Cependant, il est important d'étudier l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines afin de disposer d'un modèle murin et de prédire la réponse clinique à la manipulation de 4-1BB. En utilisant différentes stimulations de cellules B murines primaires, nous avons identifié que le récepteur 4-1BB est exprimé à la surface des cellules B de souris suite à une stimulation avec le LPS (Lipopolysaccharides). Une caractérisation plus poussée a montré que le récepteur 4-1BB est induit dans les cellules B murines d'une manière dépendante de TLR4 (Toll Like Receptor 4). Collectivement, notre travail a démontré que la stimulation avec le LPS induit l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B murines, menant ainsi à l'induction de TRAF1. De plus, TRAF1 et LSP1 coopèrent en aval de 4-1BB pour activer la signalisation de la Map kinase ERK dans les cellules B murines de manière similaire aux cellules T. Les cellules B déficientes en TRAF1 et les cellules B déficientes en LSP1 ne sont pas en mesure d'activer la voie ERK en aval de 4-1BB et montrent un niveau d'expression du récepteur significativement diminué comparé aux cellules B d'une souris WT. Ainsi, TRAF1 et LSP1 sont nécessaires pour une expression maximale du récepteur 4-1BB à la surface cellulaire de cellules B murines et coopèrent en aval de 4-1BB afin d'activer la cascade ERK dans les cellules B murines.

Mots clés : 4-1BB(CD137), survie des lymphocytes sains et malignes, co-stimulation, lymphocytes T et B, TRAF1, LSP1, leucémie

4-1BB (CD137) is a member of the TNFR superfamily, which is involved in the transmission of survival signals in lymphocytes. TRAF1 is an adapter protein that is recruited by 4-1BB and other TNFRs and is characterized by a very restricted expression in lymphocytes, dendritic cells and some epithelial cells. TRAF1 is necessary for the expansion and survival of memory T cells in the presence of anti-4-1BB agonist *in vivo*. Also, TRAF1 is required downstream of 4-1BB to activate (phosphorylate) the MAP kinase ERK involved in the regulation of the proapoptotic molecule Bim. Upon activation of 4-1BB, TRAF1 and ERK are involved in the phosphorylation of Bim and modulation of its expression. The activation and regulation of TRAF1 and Bim have an important role in the survival of CD8 memory T cells. In this study, we used a proteomic approach in order to identify new TRAF1 binding partners. Using this strategy, we have identified that LSP1 (Leukocyte Specific Protein 1) is recruited to the 4-1BB signaling complex in a TRAF1-dependent manner. It has been shown that LSP1 is a target protein for signaling ERK / MAP kinase. Further characterization of the interaction between TRAF1 and LSP1 has shown that LSP1 binds the N-terminal unique region independently of the conserved C-terminal of TRAF1. Like the T cells deficient in TRAF1, T cells deficient in LSP1 are not capable of activating ERK downstream of 4-1BB and therefore cannot regulate Bim levels in T cells. Thus, TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB in order to activate ERK and regulate Bim levels in murine CD8 T cells. According to the literature, the 4-1BB receptor is not expressed on the surface of murine CD19⁺ B cells, but 4-1BB activation promotes the proliferation and survival of human CD19⁺ B cells. However, it is important to study the expression of 4-1BB receptor in murine B cells to have a murine model and predict the clinical response to the manipulation of 4-1BB. Using different stimulation of primary murine CD19⁺ B cells, we have found that the 4-1BB receptor is expressed on the surface of murine B cells in response to LPS (lipopolysaccharide) stimulation. Further characterization showed that the 4-1BB was induced in murine CD19⁺ B cells in a TLR4-dependent manner (Toll like Receptor 4). Collectively, our work has shown that the stimulation with LPS induces the expression of 4-1BB on the surface of murine B cells leading to the induction of TRAF1. Also, TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB to activate the signaling of the Map kinase ERK in murine B cells similarly to T cells. Similarly, as for the T cells, TRAF1^{-/-} B cells or LSP1^{-/-} B cells are not able to activate the ERK pathway downstream of 4-1BB. In addition, the B cells deficient in either TRAF1 or LSP1 show a level of expression of the 4-1BB receptor significantly decreased compared to B cells from a WT mouse. Thus, TRAF1 and LSP1 are required for maximal expression of the 4-1BB receptor on the cell surface of murine B cells and cooperate downstream of 4-1BB to activate the ERK cascade in the murine B cells.

Keywords: 4-1BB (CD137), survival of healthy and malignant cells, co-stimulation, lymphocytes T and B, TRAF1, LSP1, leukemia

TABLE DE MATIÈRES	iii
RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DE MATIÈRE	iii
LISTE DE FIGURES	iv
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES	v
REMERCIEMENTS.....	vi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1. Le système immunitaire inné et adaptatif.....	1
1.2. L'origine et le développement des lymphocytes B et T	4
1.2.1. L'origine et le développement des lymphocytes B.....	5
1.2.2. L'origine et le développement des lymphocytes T.....	7
1.2.2.1.La sélection thymique	9
1.3. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs des cellules immunitaires	11
1.3.1. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs largement.....	13
1.3.2. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs spécifiques aux antigènes.....	16
1.3.2.1. Le récepteur des lymphocytes B (B Cell Receptor).....	16
1.3.2.2. Le récepteur des lymphocytes T (T Cell Receptor).....	19
1.4. Mécanismes impliqués dans la survie des lymphocytes T et lymphocytes B.....	23
1.4.1. Activation des lymphocytes B	23
1.4.2. Activation des lymphocytes T	25
1.4.3. Reconnaissance et la présentation antigénique	26
1.4.4. Les molécules de co-stimulation impliquées dans la survie des lymphocytes.....	30
1.5. Les TNFRs et leur rôle dans la survie cellulaire.....	33
1.5.1. Les TNFRs (Tumor Necrosis Factor Receptor).....	33
1.5.2. Le récepteur 4-1BB (CD137) et son rôle dans la survie cellulaire	36
1.5.3. Le rôle des interactions 4-1BB/4-1BBL dans la survie de lymphocytes T	37

1.5.4. Le rôle des interactions 4-1BB/4-1BBL dans la survie de lymphocytes B.....	41
1.6. Les molécules adaptatrices TRAFs (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor).....	42
1.6.1. TRAF1	44
1.6.2. Les signaux menant à l'induction de l'expression de TRAF1 dans les lymphocytes	48
1.6.3. La voie de signalisation en aval du récepteur 4-1BB dépendante de TRAF1	49
1.6.4. L'implication du récepteur 4-1BB et TRAF1 dans la survie des cellules malignes	51
CHAPITRE 2. PROJET DU RECHERCHE.....	54
2.1. Problématique et hypothèses	54
2.2. Objectifs.....	55
CHAPITRE 3. Articles scientifiques	56
3.1. Articles 1.....	56
3.1.1. Résumé de l'article 1	56
3.1.2. Article scientifique 1.....	57
3.2. Articles 2.....	98
3.2.1. Résumé de l'article 2	99
3.2.2. Article scientifique 2.....	100
CHAPITRE 4. DISCUSSION.....	126
4.1. Discussion.....	126
4.2. Perspectives et Conclusion	134
ANNEXE	138
I. Génération des cellules T mémoires de souris déficientes en LSP1	138
II. Induction du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B humaines en provenance d'un donneur sain. Induction de l'expression de TRAF1 et LSP1 dans les cellules B humaines saines.....	141
III. Évaluation des niveaux d'expression de TRAF1 et LSP1 dans les lysats cellulaires en provenance des patients atteintes la Leucémie Lymphoïde Chronique	143
BIBLIOGRAPHIE.....	144

Chapitre 1

Figure 1. Le système immunitaire inné et adaptatif.

Figure 2. Les cellules du système immunitaire proviennent des précurseurs communs de la moelle osseuse.

Figure 3. Les stades du développement des lymphocytes B.

Figure 4. Représentation schématique de différents stades du développement des lymphocytes T humains et murins et leurs marqueurs correspondants.

Figure 5. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires en provenance des pathogènes (PRR).

Figure 6. Représentation de récepteur de lymphocytes B (BCR).

Figure 7. Le complexe TCR/CD3 des lymphocytes T.

Figure 8. L'activation de lymphocytes B dépendante et indépendante de cellules T.

Figure 9. La famille TNFR/TNF-L.

Figure 10. Les cascades de signalisations des TNFRs dépendantes de TRAFs

Figure 11. Transduction du signal par le récepteur 4-1BB dans les lymphocytes T.

Figure 12. La représentation schématique de membres de la famille TRAFs.

Chapitre 3

Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells.

Figure 1. Identification of LSP1 within the 4-1BB signaling complex.

Figure 2. Identification of LSP1 within the TRAF1 signaling complex.

Figure 3. TRAF1 and LSP1 are binding partners.

Figure 4. The absence of TRAF1 or LSP1 in activated T cells leads to a defect in ERK activation downstream of 4-1BB signaling.

Figure 5. TRAF1 and LSP1 are required for Bim down-regulation, downstream of 4-1BB.

Figure 6. TRAF1 and LSP1 are required for efficient expansion in response to 4-1BB.

TLR4 dependent induction of 4-1BB (CD137) surface expression in murine B cells

Figure 1. Expression of 4-1BB and 4-1BBL on murine B cells.

Figure 2. Induction of 4-1BB expression in murine CD19 B cells following LPS stimulation.

Figure 3. TLR4 dependent induction of 4-1BB expression in murine B cells

Figure 4. Induction of TRAF1 expression in murine CD19 B cells following LPS stimulation

Figure 5. The absence of TRAF1 and LSP1 in murine CD19 B cells leads to defective ERK activation downstream of 4-1BB signaling.

Annexe

Figure 1. La représentation du vecteur rétroviral RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen.

Figure 2. Schéma générale montrant les étapes de génération des cellules T CD8 mémoires déficientes en LSP1.

Figure 3. Analyse des cellules T CD8 mémoires, control LSP1 et LSP1 déficientes par Western blot.

Figure 4. Les graphiques FACS représentant le pourcentage des cellules T CD8 mémoires ZsGreen⁺.

Figure 5. 4-1BB (CD137) is induced by the CD40 signal on human CD19⁺ B cells.

Figure 6. Induction of TRAF1 expression in human CD19⁺ B cells.

Figure 7. Cellules B CD19⁺ d'un donneur sain vs. cellules B en provenance des patients atteints la Leucémie Lymphoïde Chronique.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

v

B

Bim: Bcl-2 interacting mediator of cell death

BCR : Récepteur des lymphocytes B / (B-Cell Receptor)

C

CD40L: CD40 ligand ou CD154

CD137L (4-1BBL) : CD137 ligand ou 4-1BB ligand

CPA : Cellule présentatrice d'antigène/ (*Antigen Presenting Cells*)

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique/ (*Chronic Lymphocytic Leukemia*)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité / (*Major Histocompatibility Complex*)

CTL : Lymphocyte T cytotoxique/ (*Cytotoxic T Lymphocyte*)

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4

D

DC : Cellule dendritique / (*Dendritic cell*)

E

ERK: kinase régulées par des signaux extracellulaires / (*Extracellular signal Regulated Kinase*)

F

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

I

IFN γ : Interféron gamma (γ)

IL-15 : Interleukine 15

IL-2 : Interleukine 2

IL-21 : Interleukine 21

IL-4 : Interleukine 4

L

LPS : Lypopolysaccharides

LSP1 : Leukocyte Specific Protein 1

M

MFI : intensité de fluorescence moyenne/ (*Mean Fluorescence Intensity*)

N

NF- κ B : facteur de transcription nucléaire kappa B / (*Nuclear factor-kappa B*)

NK cells –Natural Killer cells

P

PBMCs : cellules mononuclées périphériques du sang/ (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PD-L1 : ligand 1 du récepteur de mort programmé 1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*)

PAMP : Molécule associée aux pathogènes/ (*Pathogen-associated molecular pattern*)

T

TCR : Récepteur des cellules T/ (*T-cell Receptor*)

TLR: Les récepteurs de type Toll / (*Toll Like Receptor*)

TNFR: récepteur du facteur de nécrose tumorale/ (*Tumor Necrosis Factor Receptor*)

TRAF: facteur associé au récepteur du TNF/ (*TNF Receptor Associated Factor*)

REMERCIEMENTS

vi

Je tiens tout d'abord remercier mon directeur Dr. Laurent Sabbagh de m'avoir acceptée dans son laboratoire, d'abord comme stagiaire en 2011 et ensuite comme étudiante graduée. Merci d'avoir eu la confiance en moi, d'avoir toujours été à l'écoute tout au long du développement du projet de maîtrise et de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien consacré pour moi et sans quoi ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Son soutien pour le projet de ma maîtrise est grandement apprécié.

J'aimerais remercier également mes collègues Yousouf Soumounou, Eustache Oussa et Geneviève Dubeau-Laramée pour leur aide, leur soutien ainsi que pour l'ambiance exceptionnelle dans laquelle nous avons travaillé au laboratoire. J'ai grandement apprécié votre esprit d'équipe, votre disponibilité ainsi que votre support.

J'aimerais remercier également Dr. Denis-Claude Roy et Dr. Éric Milot du Centre de recherche Hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leur contribution me permettant d'effectuer les études des cellules B humaines saines et malignes.

Merci à Martine Dupuis de la Plateforme de Cytométrie en flux du Centre de recherche HMR pour son aide et sa disponibilité.

Merci à Dr. Walid Mourad, membre de mon comité d'évaluation, de m'avoir acceptée dans son laboratoire comme une stagiaire d'été afin de me permettre d'approfondir mes connaissances en immunologie concernant les interactions CD40/CD40L.

J'aimerais remercier aussi ma famille d'ici ou de l'autre côté de l'Atlantique, pour leur support constant et inconditionnel ainsi que pour leur soutien et leur patience envers moi pendant mes études.

Enfin, j'aimerais également remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1. Le système immunitaire

1.1 Le système immunitaire inné et adaptatif

Le système immunitaire joue un rôle clé dans la protection du corps contre des agents pathogènes étrangers, les cancers ainsi que contre les différentes substances toxiques présentes dans la vie quotidienne. Les mécanismes bien contrôlés permettent à l'organisme de se protéger contre des virus et des microorganismes infectieux qui nous entourent afin de garder l'équilibre et le bon fonctionnement du corps. Différents types des cellules participent à la protection contre les agents pathogènes, dont la plupart proviennent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et sont collectivement nommées les leucocytes. Ces cellules peuvent entrer dans les deux voies de différenciations, soit la voie myéloïde impliquant les monocytes/macrophages, cellules dendritiques, les granulocytes, les plaquettes et les érythrocytes, ou la voie lymphoïde, ce qui donne lieu à des cellules NK (Natural killer) et les lymphocytes (cellules T et B) (*Delves, P., 2007*).

Pour être activées, les cellules du système immunitaire doivent détecter la présence d'un agent pathogène étranger (un antigène) dans l'organisme, ce qui va déclencher une réaction connue comme la réponse immunitaire (*Delves, P., 2007*). Le système immunitaire peut être divisé en système de l'immunité naturelle ou inné et le système immunitaire adaptatif (*Figure 1*). Le système inné est composé de cellules phagocytaires et les cellules NK qui sont capables de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques des antigènes. De plus, le système inné est toujours prêt à réagir immédiatement après la détection d'une grande diversité de pathogènes étrangers, mais la réponse suivie n'est ni caractérisée par une persistance ni par une spécificité contre aucun pathogène spécifique. Par contre, une réponse adaptative prend du temps à se développer et est caractérisée par une spécificité contre un antigène donné. Cette réponse assure une protection de longue durée contre un pathogène spécifique car les cellules impliquées dans la réponse adaptative sont capables de générer une mémoire immunologique spécifique, suite à la première réponse immunitaire (*Delves, P., 2007*).

Immunité innée

Immunité adaptative

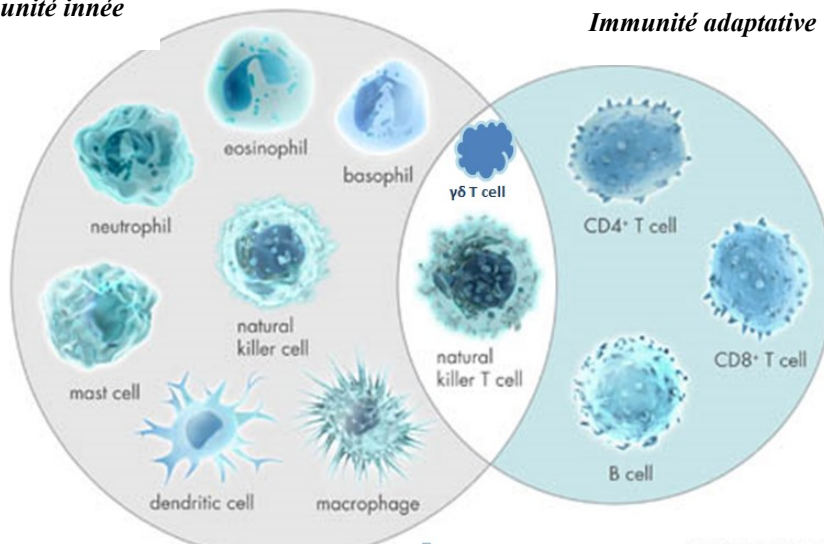


Figure 1. Le système immunitaire inné et adaptatif. Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre l'infection. Le système inné est composé des cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques), des granulocytes (mastocytes, éosinophiles et basophiles) et des cellules NK. La réponse du système inné est rapide et de courte durée. La réponse immunitaire adaptative est plus lente à se développer, mais elle est caractérisée par une spécificité antigénique et par la mémoire immunologique. La réponse immunitaire adaptative est médiée par les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. Les cellules NK-T et les cellules T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes cytotoxiques qui chevauchent l'immunité innée et adaptative (Modifié d'Ehrlich, E., 2011).

Les principaux joueurs clés de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes T et les lymphocytes B qui, en fait, sont spécifiques pour des antigènes individuels. Lorsqu'ils rencontrent leur antigène spécifique pour la première fois, ils induisent une réponse immunitaire primaire en produisant non seulement les cellules et molécules pour traiter la menace, mais aussi des cellules mémoires spécifiques. Ces cellules spécifiques représentent une population de lymphocytes qui sont développés en nombre et ont la capacité de générer une réponse immunitaire qualitative et quantitative secondaire supérieure lors d'une nouvelle agression par ce même antigène. L'efficacité et la spécificité de cette réponse repose sur l'existence de différentes sous-populations préexistantes de lymphocytes, chacune étant capable de reconnaître un antigène spécifique. Ce répertoire très élevé de motifs qui peuvent être reconnus permet d'enclencher une réponse dite humorale dans laquelle les lymphocytes B sont impliqués dans la production des anticorps ainsi qu'une réponse dite cellulaire assurée par les lymphocytes T, qui expriment un récepteur spécifique à leur surface nommé le récepteur des cellules T (TCR). L'anticorps ou le TCR exprimé par une cellule dite naïve peut reconnaître spécifiquement un

seul antigène. Après la reconnaissance de son antigène, chaque population sera amplifiée par la prolifération et ensuite activée pour la production des anticorps (dans le cas des lymphocytes B) ou devient effectrice (dans le cas des lymphocytes T) afin de détruire les cellules porteuses de l'antigène en question. Après l'élimination de l'antigène, la plupart des cellules de la sous-population amplifiée meurent par apoptose (mort cellulaire programmée), mais quelques cellules survivent et assurent la mémoire immunologique. Ces cellules sont prêtes à agir plus vite et plus efficacement lors d'une nouvelle rencontre du même antigène en induisant à nouveau leur activation et prolifération et ce processus est connu comme la réponse immunitaire secondaire (Delves, P., 2007). En effet, les deux réponses du système inné ou adaptatif sont responsables d'un système de défense efficace et remarquable. L'activation du système inné se faisant de manière immédiate va permettre la défense de l'hôte contre différents agents infectieux. En parallèle de la réponse innée, avec quelques jours de délai, c'est le système adaptatif qui va s'activer par le système immunitaire inné permettant l'amplification de la réponse immunitaire, induisant à la fois une réponse spécifique à l'antigène et une réponse mémoire assurant une clairance plus efficace du même pathogène si l'organisme y est de nouveau confronté.

1.2. L'origine et le développement des lymphocytes T et B

Toutes les cellules du système immunitaire, dont les lymphocytes, proviennent des cellules souches hématopoïétiques (*HSC* pour *Hematopoietic Stem Cells*) de la moelle osseuse. Ces cellules donnent la naissance à deux types des cellules souches soit un progéniteur myéloïde commun ou un progéniteur lymphoïde commun (*Figure 2*).

Le progéniteur myéloïde commun mène au développement des cellules de la lignée myéloïde dont les érythrocytes (les globules rouges), les plaquettes, les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, les monocytes et macrophages. *In vivo*, les précurseurs lymphoïdes communs qui proviennent des HSC se caractérisent par la capacité à reconstituer de façon restreinte la lignée lymphoïde dont les cellules T, B et NK (Natural Killer cells). Le précurseur lymphoïde commun donne aussi la naissance à une petite population des cellules dendritiques (*Figure 2*) (Baldrige, M.T., et al, 2011).

Génération des cellules immunitaires

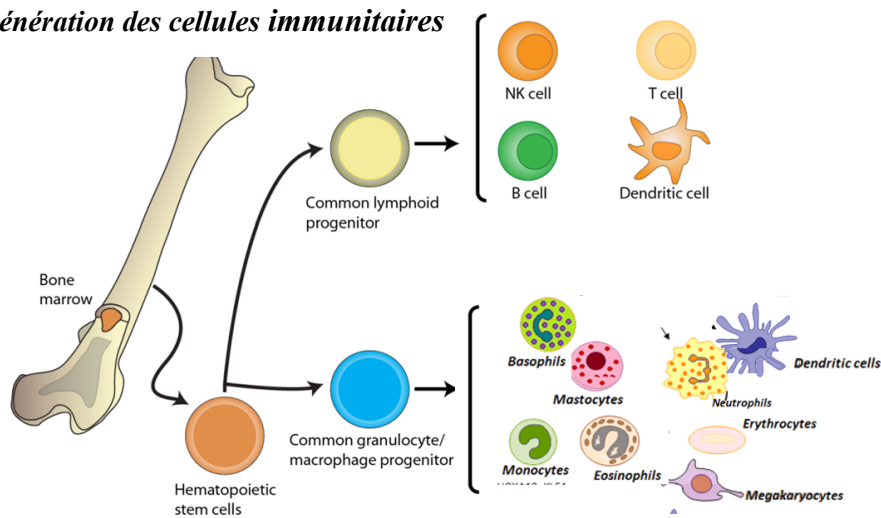


Figure 2. Les cellules du système immunitaire proviennent des précurseurs communs de la moelle osseuse. La plupart des cellules du système immunitaire inné et adaptatif proviennent des cellules souches hématopoïétiques (HSC pour **H**ematopoietic **S**tam **C**ells) de la moelle osseuse. Deux lignées principales de cellules immunitaires sont connues : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. Le précurseur lymphoïde donne naissance aux cellules du système adaptatif, notamment les lymphocytes T, B ainsi qu'aux cellules NK (Natural Killer Cells) du système inné alors que le progéniteur myéloïde commun donne naissance aux cellules du système immunitaire inné, dont les érythrocytes (les globules rouges), les plaquettes, les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques (Modifié de Morgan, M.E.).

1.2.1. L'origine et le développement des lymphocytes B

Durant le développement des lymphocytes B on peut distinguer deux phases principales à savoir : dépendante ou indépendante de la présence d'antigène. La phase de différenciation et de maturation des lymphocytes B indépendante de l'antigène se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de lymphocytes B immatures exprimant des immunoglobulines de surface qui sont capables de reconnaître un antigène donné. La phase d'activation et de différenciation qui dépend de l'antigène (du soi ou du non-soi) mène à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques à cet antigène. En fait, les étapes qui mènent à la différenciation de la cellule souche hématopoïétique à cellule B immature se déroulent dans la moelle osseuse en absence d'une stimulation antigénique. Lors de la différenciation des cellules B dépendante de l'antigène, les cellules B immatures (ou naïves) qui ont quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire caractérisé par la sélection périphérique. Ensuite, les cellules B qui ont survécu la sélection périphérique expriment à la surface des IgD et des IgM

et se différencient soit en lymphocytes B conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des cellules T, soit en lymphocytes B de la zone marginale qui sont impliqués dans les réponses humorales indépendantes de lymphocytes T (Abbas, A.K. Et al, 2007).

Dans une rate adulte, il y a environ 80% de lymphocytes B folliculaires capables de coloniser les ganglions lymphatiques qui seront activés après la rencontre avec leur antigène correspondant. En fait, les lymphocytes B peuvent se différencier en plasmocytes (à IgM) caractérisées d'une courte durée de vie ou peuvent subir les processus d'hyper mutation somatique et de commutation isotypique et ensuite se différencier en plasmocytes ou en cellules B mémoires d'une longue durée de vie (Figure 3) (Abbas, A.K. Et al, 2007).

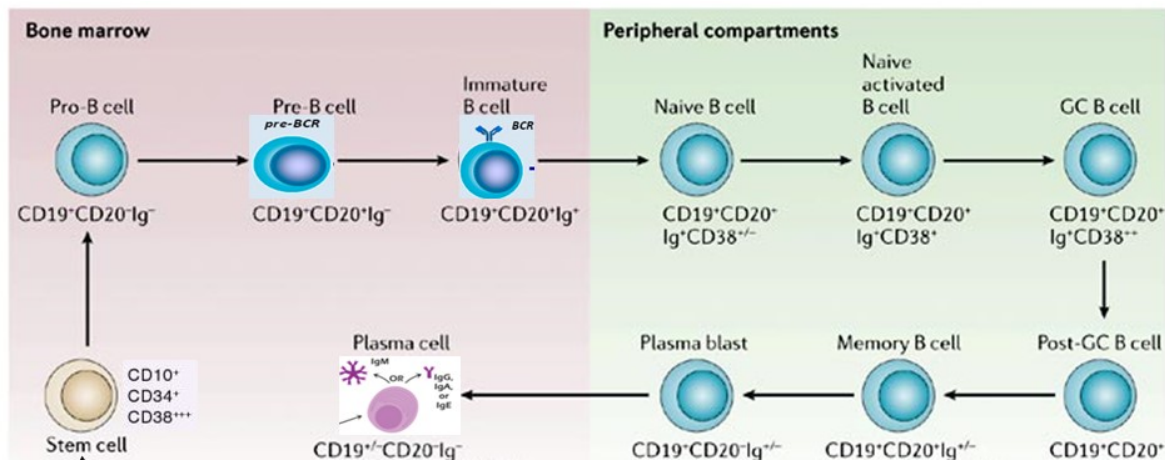


Figure 3. Les stades du développement des lymphocytes B. Les lymphocytes B proviennent de *cellules souches hématopoïétiques* (Hematopoietic Stem Cells) se caractérisant par la présence à leur surface du marqueur CD34. Le stade pro-B se caractérise par les réarrangements des gènes d'immunoglobulines, l'apparition du marqueur spécifique de surface CD19 et la synthèse d'une chaîne lourde μ intra cytoplasmique. Dans le stade pré-B, le complexe pre-BCR est formé permettant ainsi à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation et d'entrer dans une phase d'expansion clonale. Puis, dans le stade B immature, une chaîne légère classique remplace le pseudo chaîne légère et donne naissance à des IgM de surface conférant à la cellule sa spécificité de reconnaissance de l'antigène. Les cellules B immatures (ou naïves) coexpriment les deux types d'immunoglobulines avec la même spécificité et sont sujets à un processus de sélection négative. Au cours de la phase de sélection négative toutes les cellules qui possèdent des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées et les cellules qui survivent peuvent quitter la moelle osseuse ($IgM^+ IgD^+$) afin de se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires où ces lymphocytes vont subir les dernières étapes de maturation (Modifié d'Edwards et al, 2006).

Les lymphocytes B mémoires représentent une petite population de cellules capables de persister sans proliférer jusqu'à plusieurs années chez l'homme. D'ailleurs, les cellules B mémoires se caractérisent par la capacité de répondre très rapidement à des pathogènes, de présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire ainsi que de se différencier en plasmocytes. Ces dernières sont des cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale se caractérisant par une durée de vie courte ou longue selon le type de signaux reçus lors de la stimulation antigénique ainsi que l'expression à leur surface cellulaire des marqueurs CD38 et CD138. Les plasmocytes sont impliqués dans la production et la sécrétion des anticorps pour l'ensemble de l'organisme (*Abbas, A.K. Et al, 2007*).

1.2.2. L'origine et le développement des lymphocytes T

Les lymphocytes T, comme les lymphocytes B, proviennent des cellules souches hématopoïétiques qui se différencient dans la moelle osseuse en précurseurs lymphoïdes communs. Les précurseurs des lymphocytes T, contrairement aux lymphocytes B, ont besoin de quitter la moelle osseuse pour se rendre jusqu'au thymus ou ils peuvent atteindre leurs maturité (*Figure 4*). Le rôle principal du thymus est la génération d'un répertoire spécifique de lymphocytes T capables de reconnaître tous les antigènes étrangers et bien distinguer les éléments du soi (*Germain, R.N., 2002*).

Le développement des lymphocytes T a lieu dans le thymus. À leur arrivée dans le thymus, les précurseurs des cellules T nommées "progéniteurs lymphoïdes thymiques" n'expriment pas les molécules de surface spécifiques caractéristiques notamment les molécules CD4 ou CD8. Les lymphocytes passeront par différentes étapes de différenciation menant à l'expression des molécules de surface spécifiques CD4 et CD8, soit doubles négatives (DN : $CD4^+CD8^-$), doubles positives (DP : $CD4^+CD8^+$) et finalement simples positives (SP : $CD4^+$ ou $CD8^+$) avant de devenir matures et migrer vers la périphérie (*Figure 4*).

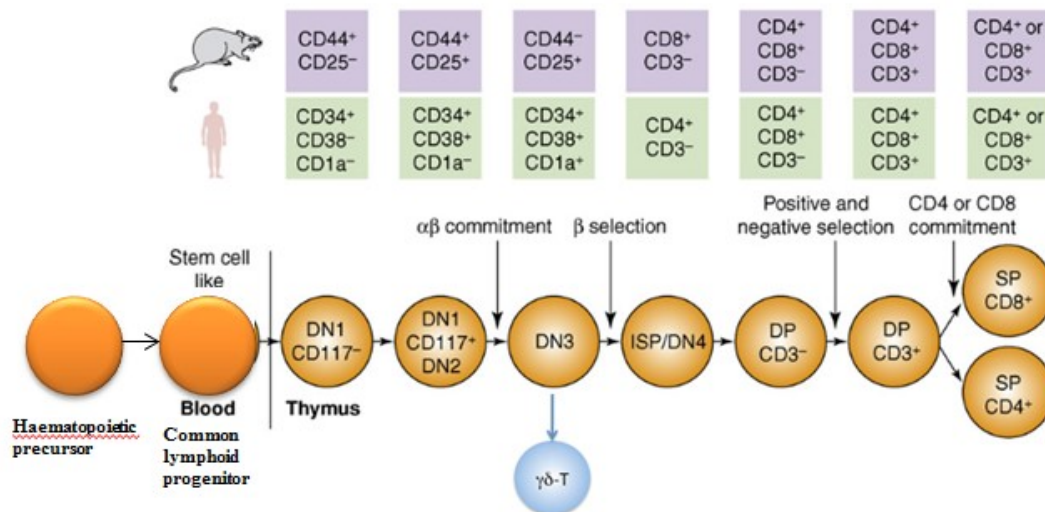


Figure 4. Représentation schématique de différents stades du développement des lymphocytes T humains et murins et leurs marqueurs correspondants. La migration des précurseurs lymphoïdes communs se fait à partir de la moelle osseuse vers le thymus où les thymocytes terminent leur maturation. Ces cellules sont appelées thymocytes doubles négatifs (DN1 jusqu'à DN4) parce qu'elles n'expriment pas un récepteur des cellules T (TCR) fonctionnel ainsi que corécepteurs CD4 ou CD8, caractéristique des lymphocytes T. Pour atteindre le stade double positif où les lymphocytes expriment le TCR et les corécepteurs CD4 et CD8 à leur surface, les thymocytes doivent passer à travers 4 étapes de maturation pour réarranger les chaînes α et β du TCR. Ensuite, les thymocytes doubles positifs (DP) vont entrer en contact avec les cellules présentatrices d'antigène qui expriment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH classe I ou II) en présentant différents peptides antigéniques du soi. Les thymocytes qui ne répondent pas suffisamment ou réagissent fortement à la présentation antigénique vont mourir par l'apoptose (sélection négative). Les thymocytes DP qui répondent correctement à la présentation antigénique du CMH classe II deviendront lymphocytes T CD4 simples positifs alors que ceux qui répondent au CMH classe I vont devenir les lymphocytes T CD8 simples positifs. Les lymphocytes T simples positifs (CD4+ ou CD8+) vont quitter le thymus et vont migrer vers la périphérie (Modifié de Weerkamp, F., et al, 2006).

Le stade DN peut être divisé en quatre étapes de maturation (DN1 à DN4). Les "progéniteurs lymphoïdes thymiques" (stade DN1) expriment des niveaux élevés des molécules de surface CD44 et CD117 (stem-cell factor receptor), alors qu'elles n'expriment pas le CD25 (chaîne α du récepteur de l'interleukine-2 (IL-2)). Les cellules dans cet état représentent les thymocytes immatures qui ont la capacité de générer des cellules NK (Natural Killer), des lymphocytes B, des cellules dendritiques thymiques ainsi que des lymphocytes T (Ardavin, C. et al, 1993), (Weerkamp, F., et al, 2006). L'étape de développement DN2 est caractérisée par l'apparition de la molécule de surface CD25 et les cellules ont le phénotype suivant : CD4-/CD8-/CD117+/CD44+/CD25+. Ces cellules peuvent générer les deux types de lymphocytes T (α/β et γ/δ) ainsi que les cellules dendritiques. Par contre, elles ne peuvent plus se différencier en cellules B ou NK. Le passage de DN1 à DN2 est accompagné d'une prolifération cellulaire

marquée. Puis, le développement se poursuit par la diminution de l'expression des molécules de surface CD117 et CD44. Alors, les cellules au stade DN3 sont CD4⁻/CD8⁻/CD117⁻/faible CD44⁺/faible CD25⁺. À cette étape, quatre événements surviennent et marquent le développement des cellules T, à savoir : le réarrangement des chaînes β , γ et δ du récepteur de surface des lymphocytes T (T Cell Receptor), l'engagement des cellules dans la voie de maturation exclusive au lymphocyte T (perte de la pluripotence), la sélection β et l'exclusion allélique (Ardavin, C. et al, 1993), (Weerkamp, F., et al, 2006), (Germain, R.N., 2002). Le réarrangement des chaînes β , γ et δ du TCR est un processus caractérisé par un rapprochement physique des gènes des différents segments des chaînes du TCR, (région constante (C), variable (V), de diversité (D) ou de jonction (J)) situés à des endroits éloignés, par l'action sur l'ADN de recombinases et par épissage de l'ARN. Ce processus mènera à l'expression d'un TCR fonctionnel. Les TCRs de spécificité différente sont générés par les différentes combinaisons des régions V, D et J. Cependant un des deux loci hérités de la chaîne β est réarrangé fonctionnellement et exprimé sur un lymphocyte T donnée. Ce phénomène survient car le réarrangement productif d'un locus TCR sur un chromosome inhibe le réarrangement du locus allélique correspondant sur l'autre chromosome. Le phénomène est connu sous le nom d'exclusion allélique (Uematsu, Y., et al, 1988). Finalement, les lymphocytes qui auront réarrangé de façon adéquate la chaîne β du TCR vont poursuivre leur maturation, un processus nommé la sélection β . Ainsi, les lymphocytes vont entrer dans une phase de prolifération. La perte d'expression de CD25 et le commencement du réarrangement de leur loci de la chaîne α du TCR est une caractéristique des cellules au stade DN4. Les dimères formés de la chaîne β réarrangée et de la chaîne pre-T α permettront la transduction de signaux pour la maturation au stade double positif. Dans ce stade, la sélection thymique va prendre place (Uematsu, Y., et al, 1988).

1.2.2.1. La sélection thymique

Le système immunitaire efficace permet à son hôte d'éliminer des agents étrangers (les antigènes) sans réagir contre lui-même et engendrer l'auto-immunité. Une telle distinction est rendue possible grâce à la sélection thymique au cours du stade de développement double positif des cellules T. En effet, la sélection thymique va permettre le passage du stade Double positif

(DP) au stade Simple positif (SP) exclusivement si le TCR d'un lymphocyte T donné reconnaît les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de l'hôte (restriction par le CMH) et n'a aucune spécificité pour un antigène du soi. Par contre, si le TCR d'un lymphocyte reconnaît un antigène du soi avec le CMH de l'hôte, ce lymphocyte auto-réactif sera éliminé par la sélection négative. De plus, si le TCR est incapable de reconnaître le CMH, la cellule va mourir. Les thymocytes immatures ne réussissent la sélection positive que dans une proportion de 5%. Cette sélection positive va permettre d'éliminer par apoptose les cellules n'ayant pas répondu aux molécules du CMH ou ayant montré une affinité trop élevée pour un complexe antigène/CMH, et de sélectionner les précurseurs des cellules T ayant un réarrangement du TCR correct. Les thymocytes ayant survécu à la sélection positive progresseront vers un stade simple positif (SP) exprimant soit le corécepteur CD4⁺ ou CD8⁺ selon que le TCR se lie à des complexes CMH classe II ou CMH classe I respectivement. Les lymphocytes dont le TCR reconnaît les molécules du CMH de classe II deviendront CD4⁺, alors que les cellules T possédant un TCR reconnaissant les molécules du CMH de classe I deviendront des cellules CD8⁺ (*Figure 4*). Puis, les lymphocytes vont quitter le thymus afin de se rendre dans la circulation sanguine pour pouvoir circuler jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, la rate ou les ganglions lymphatiques où ils pourront rencontrer leurs antigènes afin d'initier une réponse immunitaire primaire. Il existe deux types de lymphocytes T : les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 (*Germain, R.N., 2002*).

La fonction de lymphocytes T CD4⁺ appelés aussi T_H (lymphocytes T « helper »), est d'activer les lymphocytes T CD8⁺ ainsi que d'autres cellules immunitaires en sécrétant des protéines solubles (les cytokines) nécessaires pour une réponse immunitaire adéquate. Les cellules T CD4⁺ sont impliquées dans la reconnaissance des complexes peptides antigéniques/CMHII présentés à la surface des cellules présentatrice d'antigènes, permettant ainsi la prolifération des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps. Les deux catégories les plus importantes de lymphocytes T CD4⁺, se caractérisant par des rôles différents dans la réponse immunitaire, sont les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} (*Romagnani, S., 2000*).

Les cellules T_{H1} sont impliquées dans les réponses contre les infections bactériennes intracellulaires et produisent des cytokines pro inflammatoires comme l'IFN γ , l'IL-2 et le TNF α qui ont un effet sur la fixation des anticorps par les cellules B, sur l'activation des macrophages

et des neutrophiles ainsi que sur l'activation de lymphocytes T CD8 cytotoxiques (*Romagnani, S., 2000*). Les cellules T_{H2} sont impliquées dans la production de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, et IL-13, qui induisent des réponses d'anticorps fortes, y compris les IgE, favorisant la différenciation et l'activation des éosinophiles. En fait, les cellules T CD4⁺ stimulent principalement les lymphocytes B afin de produire des anticorps spécifiques.

Une autre sous-population de lymphocytes T CD4, les cellules T_{H17}, représentent la première sous-population des lymphocytes T effecteurs qui sont générés en réponse à une infection. Suite à la rencontre avec le pathogène, les cellules dendritiques synthétisent l'IL-6 et le *Transforming growth factor beta* (TGF-β). En absence de l'IL-4, d'IFNγ ou l'IL-12 les cytokines suppressives l'IL-6 et le TGFβ agissent sur le statut de cellules T CD4 naïves en les orientant vers les cellules T_{H17} et non T_{H1} ou T_{H2}. Lorsque les cellules T_{H17} rencontrent l'antigène du pathogène, elles synthétisent et libèrent les cytokines l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22. L'action importante de l'IL-17 est l'induction de la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules environnantes en attirant ainsi les neutrophiles. En effet, la population de cellules T_{H17} est importante pour l'amplification de la réaction inflammatoire démarrée par le système inné dans le site d'infection (*Janeway et al, 2009*).

Il y a une petite sous population de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires qui exprime, en plus du corécepteur CD4, le CD25 ainsi que le facteur de transcription nucléaire *Forkhead box protein 3* (Foxp3) et sont nommées les cellules T régulatrices (Treg). Le facteur de transcription Foxp3 est essentiel au développement des cellules T reg. La molécule CD25 est la sous-unité alpha du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2). Les cellules T reg sont impliquées dans la production des cytokines à l'action immuno-régulatrice dont l'IL-10 et le TGF-β ainsi que dans le contrôle de l'auto-immunité (*Romagnani, S., 2000*). Une réduction du nombre des cellules T reg ou une altération de leur fonction mène à certaines maladies auto-immunes comme le mélanome ou le carcinome à cellules rénales. Un excès des lymphocytes T reg mène à l'inhibition de l'immunité anti-tumorale (*Berger, C.T. et al, 2015*). De plus, dans plusieurs études il a été démontré que dans le sang périphérique, dans les tumeurs primaires et dans les métastases de patients atteints du mélanome, les lymphocytes T reg sont présents d'un nombre massif (*Jacobs, J.FM. et al, 2012*). Il a été démontré que les cellules T reg qui possèdent l'activité immunosuppressives peuvent changer leur type et devenir des cellules effectrices.

Les cellules T reg sont capables de tuer directement les cellules présentatrices d'antigènes ou des lymphocytes T effecteurs à l'aide des granzymes et des perforines. Les cellules T reg expriment fortement la molécule CTLA4 connue avec son effet inhibiteur. L'interaction de CTLA4 exprimée à la surface des cellules T reg et les molécules CD80 ou CD86 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène va mener à l'inhibition de la fonction de CPA et à l'inhibition de l'expression des molécules co-stimulatrices, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme TNF α et IL-6. De plus, les cellules T reg elles-mêmes sécrètent des cytokines inhibitrices comme TGF β et l'IL-10 en inhibant l'activité des CPA et des autres lymphocytes T (*Kindt, T.J. et al, 2008*). Il existe des lymphocytes T CD8 régulateurs qui expriment Foxp3 et peuvent être induites en présence de l'antigène et TGF β . En effet le phénotype de cette population est compliqué et les marqueurs de surface cellulaire comme les récepteurs de basse et de haute affinité pour l'IL-2 (CD122 et CD25), le marqueur des cellules dendritiques (CD11c) ainsi que le régulateur transcriptionnel Foxp3 peuvent être présentes (*Owen, J.A. et al, 2014*).

Les lymphocytes T CD8⁺ (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocytes*) activés se caractérisent par une activité cytolytique et sont capables d'éliminer différents antigènes étrangers ou des cellules infectées. Leur activité cytotoxique est le résultat de la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et la sécrétion des différentes molécules cytotoxiques dont l'IFN γ , perforine et le granzyme B. Au cours d'une infection par un pathogène, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules T CD8⁺ naïves spécifiques mènent à la génération d'un grand nombre des cellules T effectrices cytotoxiques (lymphocytes T cytotoxiques). Les lymphocytes T sont capables d'éliminer le pathogène à l'aide de leurs molécules cytotoxiques sécrétés ou l'expression de FasL (CD95). Après l'élimination de l'antigène, la contraction clonale permettra l'élimination par apoptose de la majorité de ces cellules T (environ 95%) activées par l'antigène (*Zamoyska, R., 1998 ; Germain, R.N., 2002*). À la fin de la réponse primaire, seulement une petite population des lymphocytes T activés se différencie en lymphocytes à mémoires spécifiques contre ce même antigène. Cette population de cellules T mémoires survit et persistera afin de protéger l'hôte contre une réinfection par le même antigène. De plus, elle est nécessaire pour permettre une réponse immunitaire plus efficace lors d'une réexposition du même antigène. La réponse secondaire nécessite le recrutement d'un nombre beaucoup plus élevé et plus réactif de cellules T spécifiques d'un antigène donné. La réponse

immunitaire secondaire dépend des lymphocytes T mémoire qui possèdent un TCR de haute affinité pour l'antigène. Ils sont caractérisés par des marqueurs membranaires spécifiques. La présence ou l'absence du récepteur de chimiokines (CCR7), de CD62L (ou L-Sélectine) ainsi que CD45RA permet de distinguer deux types de lymphocytes T mémoire, les lymphocytes T de mémoire centrale et lymphocytes T mémoire effecteurs. Les lymphocytes T de mémoire centrale se caractérisent par le phénotype $CCR7^+ / CD45RA^-$ exprimant aussi CD62L, alors que le phénotype de lymphocytes T mémoire effecteurs est de $CCR7^- / CD45RA^-$ et généralement, il n'exprime pas CD62L. Les lymphocytes T mémoire effecteurs sont capables de réagir immédiatement suite à une réexposition à l'antigène. De plus, ils prolifèrent rapidement et secrètent vite après leur activation de cytokines. Les lymphocytes T de mémoire centrale constituent plutôt une réserve pour la génération de lymphocytes T effecteurs en cas de réexposition. Les cytokines IL-7 et IL-15 sont essentielles pour la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes T mémoire (*Janeway et al, 2009, Zamoyska, R.1998; Germain, R.N.2002*).

1.3. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs des cellules immunitaires

Pour induire une réponse immunitaire, les cellules du système immunitaire ont besoin de détecter un antigène donné. Les cellules utilisent les différents récepteurs à la surface cellulaire qui peuvent être divisés en deux groupes, soit des récepteurs largement réactifs et des récepteurs antigènes-spécifiques (*Delves, P., 2007*).

1.3.1. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs largement réactifs

Le système immunitaire inné est hautement conservé parmi les espèces et offre la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahisseurs. Les cellules impliquées dans la réponse du système immunitaire inné sont équipées de nombreux types de récepteurs à la surface cellulaire afin de discriminer le soi du non-soi. Chacun de ces récepteurs est codé par des gènes séparés. Ces récepteurs sont capables de reconnaître directement des structures moléculaires communes conservés de plusieurs pathogènes. Lorsque

les cellules sont infectées par des agents pathogènes infectieux, les récepteurs cellulaires (*Figure 5*) tels que les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs de type NOD (NLRs, nucleotide oligomerization domain receptors), les récepteurs RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1) ainsi que des récepteurs de lectine de type C (C-type lectin receptor, CLR), reconnaissent des structures moléculaires de micro-organismes pathogènes connus comme PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Les PAMPs sont des molécules qui sont largement distribués parmi les différentes espèces d'agents pathogènes mais absents chez les cellules de l'hôte (*Delves, P., 2007; Jounai N., et al, 2013*). La liaison des composants du pathogène avec les PRR (Pattern Recognition Receptors) provoque une réponse très rapide.

Une fois que ces récepteurs reconnaissent les structures moléculaires en provenance de PAMPs, diverses réponses physiologiques, y compris l'inflammation, sont activées. Grâce à la reconnaissance de molécules PAMPs, les réponses immunitaires innées sont induites, et les cytokines inflammatoires sont produites dans le but d'éliminer les agents pathogènes. Cependant, l'hôte souffre parfois d'une infection ou des blessures chroniques ce qui peut entraîner la mort de la cellule hôte, conduisant à la libération des composants cellulaires de l'hôte dans l'environnement extracellulaire et la production des auto-molécules contenant des motifs moléculaires associés aux dommages. Ces composants cellulaires pourraient être considérés comme des « messagers » pour le danger et sont connues comme DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). DAMPs peuvent inclure des lipides, des métabolites et des acides nucléiques tels que l'ARN et l'ADN (*Jounai, N., et al, 2013*).

Un lipide connu pour l'induction de réponses inflammatoires est le LPS (Lipopolysaccharide), un PAMP présent dans les bactéries gram-négatives. Lors de la reconnaissance par TLR4, un membre de la famille TLRs, le LPS favorise la production de diverses cytokines inflammatoires suite à une infection bactérienne (*Jounai N., et al, 2013*). Parmi tous les TLRs (10 TLRs chez la souris et 11 chez l'homme), le récepteur TLR4 est un récepteur important impliqué dans la réponse contre les infections bactériennes. Le TLR4 seul ne peut pas reconnaître le LPS, car deux autres protéines de surface cellulaire sont nécessaires, notamment CD14 et MD2. En effet, CD14 lie le LPS et le complexe formé s'avère être le ligand de TLR4. Par la suite, le complexe TLR4/MD2 interagit avec le LPS déjà lié à CD14 suivi d'un signal envoyé au noyau de la cellule ce qui mène à l'activation du facteur de transcription NF-

κ B impliqué dans l'activation de l'expression de différents gènes nécessaires pour une réponse immunitaire adéquate (Jounai N., et al, 2013).

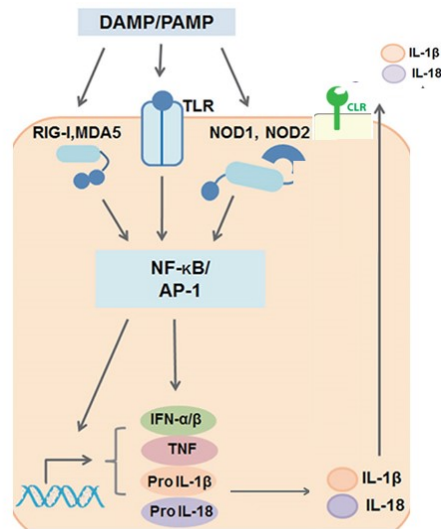


Figure 5. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires en provenance des pathogènes, (PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns et DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns). Afin de détecter des agents pathogènes, tels que les bactéries et les virus, le système immunitaire est équipé de récepteurs, appelés récepteurs spécialisés de reconnaissance des structures moléculaires conservées de micro-organismes pathogènes PRR (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs sont un élément clé du système immunitaire inné. Ils sont principalement exprimés par les cellules présentant l'antigène telles que les cellules dendritiques et les macrophages, mais ils sont également présents dans d'autres cellules immunitaires et non immunitaires. PRR sont divisés en quatre familles: soient : les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs nucléotidiques d'oligomérisation (NLR), les récepteurs de lectine de type C (CLR) et les récepteurs tels que RIG-1 like receptors (RLR). Ces récepteurs sont responsables de la détection des produits microbiens ou de signaux de danger endogènes pour déclencher les voies de signalisation en aval, ce qui entraîne la production d'IFN de type I et les cytokines pro-inflammatoires (Modifié de Lee, TH., et al, 2014).

En effet, l'activation de NF- κ B mène à l'induction de la transcription de divers gènes codant des cytokines, des chimiokines et des molécules co-stimulatrices membranaires comme les protéines de la famille de B7 qui sont nécessaires à l'induction des réponses immunitaires adaptatives face à l'infection. Les TLRs jouent un rôle clé dans les réponses induites responsables de l'inflammation et son contrôle ainsi que pour le recrutement des cellules effectrices afin de pouvoir déclencher une réponse adaptative adéquate (Jounai N., et al, 2013). D'ailleurs, dans certaines conditions, les récepteurs de la famille TLRs sont exprimés à la surface de lymphocytes, les cellules du système adaptatif (Chiron, D, et al, 2008), (Shin, H. et al, 2009), (Bourke, E. et al, 2003), (Muzio, M. et al, 2000), (Ganley-Leal, L.M. et al, 2010).

1.3.2. Reconnaissance des antigènes par des récepteurs spécifiques aux antigènes

Au début d'une infection c'est le système immunitaire inné qui s'occupe de la première défense de l'organisme, mais les réponses induites ne sont pas très efficaces car l'issue de cette réponse n'est pas caractérisée par une spécificité contre un pathogène spécifique. Par contre, les cellules principales du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes T et les lymphocytes B, possèdent des récepteurs hautement spécifiques à la surface cellulaire capables de reconnaître différents antigènes provenant de bactéries, de virus et d'autres pathogènes.

1.2.2.1. Le récepteur des lymphocytes B (BCR ou B Cell Receptor)

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes par les molécules de reconnaissance de l'antigène nommées les immunoglobulines (Ig). Les immunoglobulines sont des protéines produites par les cellules B elles-mêmes et jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (B Cell Receptor). Ils sont fixés à la membrane cellulaire et se caractérisent par une énorme gamme de spécificité antigénique. Chaque lymphocyte B produit des immunoglobulines d'une spécificité unique. Les BCR procurent aux cellules B la propriété de reconnaître directement des peptides antigéniques d'un agent pathogène (un antigène) de manière spécifique. En fait, les immunoglobulines représentent des hétérodimères protéiques, composées de deux chaînes légères L (pour Light) identiques et deux chaînes lourdes H (pour Heavy) identiques liées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures. Chaque chaîne est composée d'une région variable (V) et d'une région constante (C). L'association entre les domaines variables des chaînes légères et les domaines variables des chaînes lourdes détermine le site de fixation à l'antigène. De plus, les BCR sont associés à un dimère $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (les chaînes $Ig\alpha$ ou CD79a et $Ig\beta$ ou CD79b) (*Figure 6*). Les BCR et les anticorps ont une forme de « Y » et possèdent deux sites de liaison à l'antigène. Le BCR ne peut pas transmettre le signal car il possède une très courte région intra-cytoplasmique. La transmission du signal se fait par l'association BCR et le dimère $Ig\alpha$ - $Ig\beta$. Ce dernier possède une plus longue partie intra-cytoplasmique permettant la transmission du signal après l'activation du BCR, grâce à des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) se trouvant sur les deux chaînes du dimère. En réalité, le

dimère Ig α -Ig β n'intervient pas dans la reconnaissance de l'antigène car le site de reconnaissance d'antigène se trouve sur le BCR, et lui-même va activer le dimère par des kinases au niveau de ses motifs ITAM. Après l'activation, les lymphocytes B se transforment en plasmocytes sécrétrices des anticorps de la même spécificité que leur BCR (*Janeway et al, 2009*).

La diversité est une caractéristique du BCR et est le résultat de recombinaisons des différents segments de gènes codant les chaînes légères et les chaînes lourdes qui le composent. L'énorme répertoire de spécificité des récepteurs d'antigènes de cellules B peut être expliqué par la variation de la séquence en acides aminés dans le site de liaison à l'antigène qui est composé par des régions variables (V). La région variable de la chaîne lourde et la chaîne légère est liée à la région constante (C) qui, en assurant la signalisation lors d'une réponse immunitaire, exerce des fonctions effectrices (*Janeway et al, 2009*).

Dans les cellules B, les segments d'ADN génomique dans les gènes d'immunoglobulines sont réarrangés par un mécanisme appelé la recombinaison somatique. En fait, la recombinaison somatique de segments géniques séparés mène à la génération des gènes complets codant la région variable des immunoglobulines. La région variable d'une chaîne légère est codée par deux segments séparés d'ADN. Le premier segment est le segment génique variable (ou V_L) qui code pour la plus grande partie de la région variable alors que le deuxième segment appelé segment génique de jonction (ou J_L) code le reste de la région variable. L'association entre un segment génique variable (V_L) et un segment de jonction (J_L) d'ADN génomique mène à la formation d'un exon complet codant la totalité de la région variable de la chaîne légère. Normalement, les segments géniques variables (V_L) dans un ADN non réarrangé se trouvent à une longue distance par rapport aux segments géniques qui codent pour la région constante (C). Par contre, les segments géniques (J_L) se trouvent à une distance plus proche de segments codant la région constante (C). L'association d'un segment V_L et un segment J_L rapprochera le gène variable (V_L) de la séquence de la région constante (C). Après le réarrangement, le segment J_L de la région variable est séparé par un seul intron de la région constante (C). Finalement, après la transcription, l'exon de la région variable est relié à la région constante (C) par épissage d'ARN afin d'aboutir à l'ARN messenger complet de la chaîne légère d'immunoglobulines.

Trois segments codent pour la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines.

Entre les segments géniques V_H et J_H (afin de différencier les segments géniques de la chaîne légère V_L et J_L) se trouve un troisième segment appelé segment génique de diversité ou D_H . La recombinaison menant à la production d'une région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, le segment génique D_H est relié à un segment génique J_H . Puis, le segment V_H s'ajoute au segment déjà formé DJ_H dans le but de créer l'exon complet qui va coder la région V_H de la chaîne lourde. Finalement, l'épissage de l'ARN va permettre la jonction de la séquence codant la région variable au gène de la région constante (Janeway et al, 2009).

Dans le génome d'un individu, plusieurs segments géniques sont présents et contribuent à une base héréditaire riche de diversité. Les protéines RAG (Recombination-Activating Genes), recombinaisons propres aux lymphocytes, sont essentielles pour ces réarrangements. Le processus de jonction lui-même contribue à la diversité aussi. De plus, l'insertion aléatoire de différents nucléotides et la délétion de certains nucléotides aux extrémités de certains segments mène à la génération de la variabilité aux jonctions entre les segments géniques. Finalement, l'association de différentes régions variables de chaînes légères et lourdes mène à la formation du site de la liaison à l'antigène d'une molécule d'immunoglobulines contribuant également à la diversité. En effet, la combinaison de toutes les sources mentionnées plus haut contribue à la génération d'un vaste répertoire de spécificité d'anticorps (Janeway et al, 2009).

La région constante (C), qui est impliquée dans l'engagement des fonctions effectrices du système immunitaire (Figure 6), reste insérée dans la membrane des cellules B, ce qui explique pourquoi le récepteur de cellules B, qui est en fait fixé à la membrane cellulaire, ne possède pas des fonctions effectrices, mais dont la principale fonction est de reconnaître et de lier un antigène donné à l'aide de ses régions variables afin de transmettre un signal qui va mener à l'activation des cellules B. Ceci va résulter en expansion clonale et à la production des anticorps spécifiques. Effectivement, la principale fonction effectrice des lymphocytes B est la sécrétion des anticorps qui vont reconnaître et lier les pathogènes (Janeway et al, 2009).

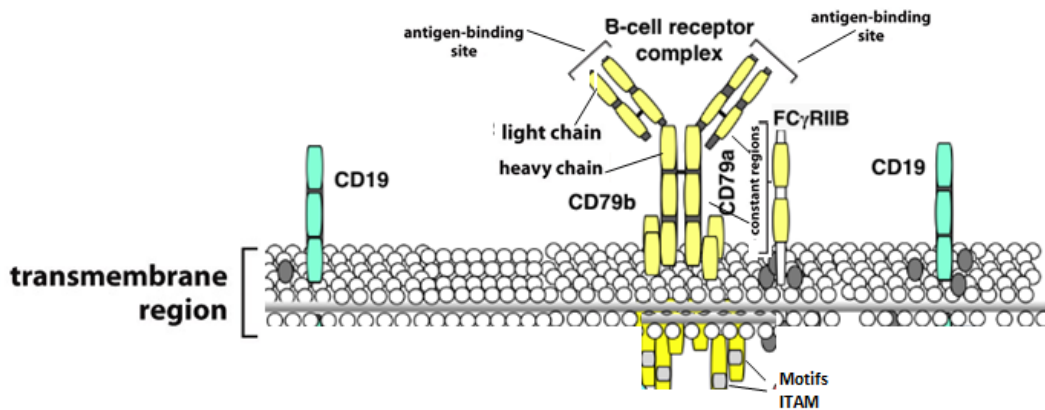


Figure 6. Représentation de récepteur de lymphocytes B (BCR). Le récepteur des lymphocytes B représente une forme membranaire des immunoglobulines (Ig). Les BCR sont des tétramères très polymorphique qui sont composées de deux chaînes légères L (pour Light) identiques et de deux chaînes lourdes H (pour Heavy) identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne lourde est liée à une chaîne légère par des ponts disulfures et les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles aussi par des ponts disulfures. Les deux chaînes contiennent des régions constantes C (extrémité C-terminale) et des régions variables V (extrémité N-terminale). Les régions variables sont différentes pour chaque lymphocyte B et à l'intérieur de ces régions se retrouvent des régions hypervariables. Les régions hypervariables lient la portion de l'antigène nommée l'épitope. De plus, le BCR est associé à des chaînes Igaou CD79a et Igβou CD79b responsables de la transduction du signal après contact avec l'antigène (Modifié de Choi, M.Y., et al, 2012).

Le récepteur BCR est généré par la recombinaison génétique d'un gène unique et les gènes Ig subissent une recombinaison dans les précurseurs de lymphocytes B (Delves, P., 2007). Dans chaque lymphocyte se produit une recombinaison différente avec une variété de mécanismes moléculaires supplémentaires ce qui augmente la diversité et conduit à la génération d'une variété immense des récepteurs antigéniques spécifiques.

1.3.2.2. Le récepteur des lymphocytes T (TCR ou T Cell Receptor)

Les récepteurs caractéristiques des lymphocytes T, TCR (T Cell Receptor), représentent des protéines membranaires fournissant aux lymphocytes T la propriété de reconnaître des fragments antigéniques peptidiques conservés et associés aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de manière spécifique. Le TCR est un hétérodimère composé

d'une chaîne alpha et une chaîne beta (TCR $\alpha\beta$) pour environ 95% des lymphocytes T et pour environ 5% des lymphocytes T une chaîne gamma et une chaîne delta (TCR $\gamma\delta$) (Delves, P., 2007).

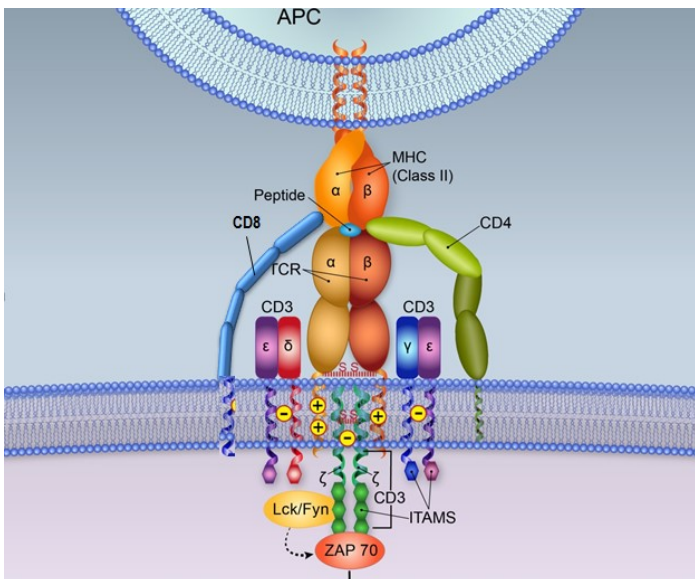


Figure 7. Le complexe TCR/CD3 des lymphocytes T. La structure d'un TCR ressemble aux immunoglobulines. Le récepteur est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β comportant chacune un domaine constant et un domaine variable. La région variable assure la diversité des lymphocytes T car chaque TCR est différent d'un lymphocyte T à l'autre. Les chaînes α et β sont reliées par un pont disulfure. Le récepteur TCR possède aussi une courte partie intra cytoplasmique COOH terminale. Le TCR reconnaît un antigène en association du complexe CD3 qui est composé des chaînes γ , δ , ϵ , et ζ . Les chaînes γ , δ , ϵ du complexe CD3 possèdent une queue intra-cytoplasmique un peu plus longue alors que la chaîne ζ comporte une longue portion intra cytoplasmique avec plusieurs motifs de type ITAM (Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif). Les ITAM possèdent plusieurs résidus tyrosine qui sont cibles de phosphorylation par différentes protéines kinases spécifiques menant ainsi à la transduction d'un signal d'activation des lymphocytes T. De plus, il y a des ITAM sur les autres chaînes du CD3. Les molécules CD4 ou CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes T qui stabilisent l'interaction TCR/CMH en recrutant des kinases de type Lck. Ces corécepteurs permettent de distinguer les lymphocytes auxiliaires exprimant la molécule CD4 et les lymphocytes cytotoxiques exprimant la molécule CD8 (Modifié de Siggs, O., et al, 2013).

Les TCR sont des hétéro-dimères très polymorphiques et sont caractérisés par différentes régions présentes au niveau des deux chaînes associées l'une à l'autre par un pont disulfure (Figure 7). Les chaînes du récepteur TCR sont membres de la famille des immunoglobulines (Ig), possédant un domaine constant (C), un domaine variable (V), un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique C-terminal (Figure 7). En fait, la structure des récepteurs TCR est similaire à celle des immunoglobulines de manière à ce que les

récepteurs TCR soient codés par des gènes homologues assemblés par la recombinaison somatique à partir des segments géniques de manière semblable aux segments géniques des immunoglobulines. Par contre, il y a une petite différence quant à la distribution de la diversité. Par exemple les locus des TCR possèdent plus des segments J résultant à une plus grande diversité des jonctions entre les segments géniques lors de réarrangements. Comparativement aux cellules B où la diversité des BCR est basée sur la hypermutation somatique des gènes V réarrangés, la diversité des TCR chez les cellules T ne semble pas déterminée par ce processus (*Janeway et al, 2009*).

Les segments géniques du TCR sont disposés et réarrangés par les mêmes enzymes comme les immunoglobulines. Le locus du TCR α ressemble largement à celui des chaînes légères des immunoglobulines et contient des segments géniques V et J (V α et J α), alors que le locus du TCR β comme celui des chaînes lourdes des immunoglobulines, en plus des segments géniques V et J (V β et J β), contient des segments géniques de diversité (D β). Le réarrangement des segments géniques du TCR se produit pendant le développement des lymphocytes T dans le thymus afin de former des exons du domaine V complet. Les mécanismes de réarrangement génique sont semblables pour les cellules B et T, et les défauts dans le control de la recombinaison V(D) J touchent à la fois les lymphocytes T et B, menant à un déficit des deux types de cellules. Une autre ressemblance entre les immunoglobulines et le TCR est la présence des nucléotides à la jonction entre les segments V, D et J du gène du TCR β réarrangé (*Janeway et al, 2009*).

La structure du site de reconnaissance d'antigène du récepteur TCR ressemble fortement à une molécule d'anticorps. Dans un anticorps, les régions hypervariables appelés aussi CDRs (Complementarity determining regions) des chaînes légères et lourdes forment le site de liaison à l'antigène. La région hypervariable CDR3 des chaînes α et β du récepteur TCR forment le centre du site de liaison à l'antigène, alors que la périphérie est composée par les régions CDR1 et CDR2 des chaînes α et β . Les régions CDRs sont codées par les segments géniques V. Le ligand d'un TCR principal (TCR $\alpha\beta$) représente un peptide lié à une molécule du CMH. La variabilité de TCR est concentrée sur le site de liaison du peptide antigénique ou la région CDR3. De plus, le TCR possède une région très courte intra-cytoplasmique qui est composée d'acides aminés basiques, autrement dit chargés positivement, ce que permet au TCR de s'associer avec les protéines du complexe CD3 qui est composé de la chaîne ζ et de trois chaînes

différentes (γ , δ et ϵ). En fait, la région transmembranaire du complexe CD3 est chargée négativement et est requise pour la transduction de signaux. L'assemblage du TCR avec les molécules CD3 forme le complexe TCR/CD3 qui fonctionne pour la signalisation des lymphocytes T ainsi que pour leur activation (*Delves, P., 2007*).

À la différence des cellules T conventionnelles qui possèdent des TCR hautement polymorphiques il existe une sous-population des cellules T appelée « invariant natural killer T cells » ou iNKT qui expriment à leur surface un récepteur TCR $\alpha\beta$ réarrangé au moyen du gène TCR α et une combinaison très limitée des gènes $V\beta$. Ainsi, ces cellules iNKT ne peuvent reconnaître que des lipides exprimés à la surface des molécules CD1d. Outre l'existence de ces cellules, il existe aussi des cellules « mucosa-associated invariant T cells » ou MAIT, ainsi que des sous-populations des cellules T $\gamma\delta$ qui possèdent des TCR soumis à de très limités réarrangements (*Lanier, L.L. 2013*).

Le TCR diffère de BCR car il ne reconnaît pas et ne peut pas fixer un antigène directement, mais il est capable de reconnaître de courts fragments peptidiques en provenance des antigènes protéiques qui sont liées aux molécules du CMH et présentées à la surface cellulaire des cellules présentatrices d'antigènes (*Bouvier, M., et al, 1994*). La liaison du complexe CMH/peptide à un corécepteur spécifique (CD4 ou CD8) exprimé à la surface des cellules T mène à l'amplification du signal transduit par le complexe TCR/CD3. Les cellules T CD8⁺ peuvent lier les molécules du CMH classe I alors que les cellules T CD4 peuvent lier les molécules du CMH classe II. Les corécepteurs CD4 et CD8 sont impliqués dans la prolongation et l'amplification d'interaction entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène. Il est important à noter que le récepteur TCR permet la reconnaissance de l'antigène alors que le complexe TCR/CD3 assure la transduction d'un signal. Les molécules CD3 et chaînes ζ associées au TCR contiennent dans leur région cytoplasmique un motif nommé Immunoreceptor-based tyrosine activation motif (ITAM). Un motif ITAM se retrouve dans chacune des chaînes du CD3 alors que les chaînes ζ en contiennent trois exemplaires. Les résidus tyrosines des motifs ITAMs deviennent phosphorylés suite à l'engagement du TCR et cette phosphorylation est à la base de l'initiation d'une série d'événements de signalisation permettant l'activation de lymphocytes T (*Smith-Garvin, J.E., et al, 2009; Delves, P., 2007; Davis, M.M. et al, 1998; Hennecke, J., et al, 2002; Luz, JG., et al, 2002*).

1.4. Mécanismes impliqués dans la survie des lymphocytes T et lymphocytes B

1.4.1 Activation des lymphocytes B

Les cellules B représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes du sang. Chez l'humain, on peut distinguer deux sous-populations de cellules B : soit les lymphocytes B naïfs (60 %) et les lymphocytes B mémoires (40 %) (Klein, U., 1998). Les lymphocytes B sont les seules cellules capables de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps. L'activation de ces cellules peut se faire de deux manières : indépendante ou dépendante de lymphocytes T. Il existe deux catégories d'antigènes impliqués dans l'activation indépendante de lymphocytes T. Les antigènes indépendants de cellules T peuvent agir indépendamment du BCR en induisant la prolifération et la différenciation des cellules B (Figure 8). Le LPS (Lypopolysaccharide), le composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif fait partie de ce groupe d'antigènes. La reconnaissance de LPS se fait par le récepteur TLR4 se trouvant à la surface des lymphocytes B et mène à l'activation des cellules B (Figure 8) (Vos, Q. et al, 2000). La deuxième catégorie d'antigènes indépendants de cellules T agissent à travers le BCR et représentent des molécules d'un haut poids moléculaire comme les polysaccharides en provenance de la paroi cellulaire de bactéries encapsulées. Un exemple est le *Streptococcus pneumonia* (Weintraub, A., 2003). Les antigènes indépendants de cellules T nécessitent plusieurs signaux et la multimérisation du BCR afin d'induire la différenciation des cellules B. Ces antigènes sont capables d'induire de façon indépendante de lymphocytes T l'activation des lymphocytes B, ainsi que d'induire la sécrétion de cytokines par d'autres cellules de l'environnement de cellule B qui vont agir sur la prolifération et la différenciation de la cellule B.

En effet, les cellules B naïves vont rencontrer ces types d'antigènes et vont proliférer rapidement en se différenciant rapidement en cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, ce qui représente le stade final de différenciation des cellules B. La plupart de plasmocytes qui ont été générés dans la rate et les ganglions pénètrent dans la moelle osseuse en libérant leurs anticorps dans le courant sanguin, alors qu'une petite population des plasmocytes reste dans les organes lymphoïdes périphériques où ils secrètent leurs anticorps. Les anticorps sécrétés par les plasmocytes dans le cadre de l'activation T-indépendante, ont une

courte durée de vie et sont surtout de type IgM, ayant une faible affinité pour l'antigène et seulement une petite population de ces plasmocytes sécrète des IgG (LeBien T.W., et al, 2008).

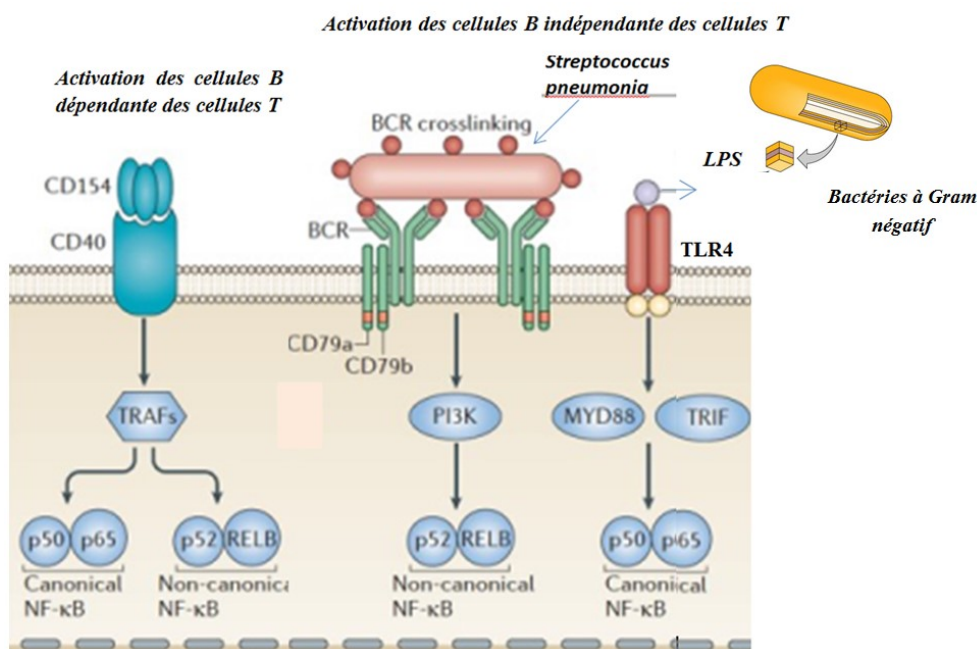


Figure 8. L'activation des lymphocytes B dépendante et indépendante des cellules T. Deux différents types d'activation de lymphocytes B sont connus. Le première type, indépendante de lymphocytes T, se fait par des antigènes thymoindépendants indépendamment du BCR ou via le BCR par les molécules en provenance d'antigènes d'un haut poids moléculaires. Le deuxième type d'activation des lymphocytes B fait appel aux antigènes thymodépendants et implique les interactions cellules T activées/cellules B via le couple de récepteur/ligand CD40/CD40L. La présence de l'IL-2 et de l'IL-4 dans l'environnement est requise pour une activation complète des cellules B (Modifié de Casali, Xu & Zan Lab).

La plupart des antigènes menant à la production d'anticorps par les plasmocytes ont besoin de la collaboration de lymphocytes T. Les lymphocytes B peuvent être activés dans les follicules par la présentation antigénique par les macrophages des ganglions lymphatiques (Batista, F.D. et al, 2009) ou par les cellules dendritiques qui sont capables aussi de présenter des antigènes aux lymphocytes B naïfs (Qi H., et al, 2006).

L'activation de lymphocytes B qui répondent aux antigènes thymodépendants nécessite trois types de signaux. Le premier signal est un résultat de la liaison de l'antigène présenté aux cellules T par les molécules du CMH classe II. Un deuxième signal de co-stimulation en provenance de l'interaction entre CD40 exprimé à la surface de cellules B et CD40L (CD154) exprimé à la surface de cellules T activées est nécessaire pour l'activation de cellules B (Figure 8). L'interaction entre les molécules CD40 et CD40L est très importante pour l'activation des lymphocytes B naïfs ainsi que celle de cellules mémoires. Au cours de cette interaction, la

cellule B reçoit de la part de la cellule T des signaux nécessaires à sa prolifération et sa maturation, comme l'IL-2 et l'IL-4, ce qui représente le troisième signal pour l'activation de cellules B (*Elgueta, R., et al, 2009*).

1.4.2 Activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes est un processus complexe et dépendant des interactions entre les lymphocytes et les autres cellules du système immunitaire. De plus, l'activation nécessite une rencontre du lymphocyte avec son antigène correspondant. En fait, pour activer les lymphocytes, un signal résultant de la liaison de l'antigène aux récepteurs spécifiques est requis, ainsi qu'un deuxième signal en provenance d'une autre cellule à l'aide des molécules de co-stimulation. Les lymphocytes T naïfs ont besoin d'être stimulés par les cellules présentatrices d'antigène, les cellules dendritiques activées. De plus, les lymphocytes T naïfs peuvent être activés par les macrophages et les cellules B qui sont aussi capables de présenter un antigène étranger à sa surface dans le contexte du CMH, en exprimant les molécules co-stimulatrices (*Janeway, et al, 2009*). En réalité, pour le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative, l'induction des molécules co-stimulatrices est indispensable car seulement un contact avec le complexe antigène/CMH n'est pas suffisant. L'absence de signaux de co-stimulation de lymphocytes mène à l'inactivation des lymphocytes naïfs et en conséquence, le lymphocyte est soit inactivé (anergie), soit le clone est supprimé par la délétion clonale.

Parmi tous les lymphocytes circulants, il y a toujours une petite sous-population qui est capable de se lier à un antigène spécifique, mais cette petite population est insuffisante pour réagir à un pathogène donné et combattre une infection. Pour répondre de façon adéquate à un antigène donné, il faut que cette petite population lymphocytaire spécifique prolifère et lorsque le nombre des clones identiques est augmenté considérablement, ces lymphocytes vont se différencier en cellules effectrices capables de déclencher une réponse immunitaire adaptative efficace (*Janeway, et al, 2009*). Dans le cas des lymphocytes T, les cellules effectrices sont soit les lymphocytes T cytotoxiques (T CD8⁺) qui sont capables de détruire les cellules infectées, soit les lymphocytes T auxiliaires (T CD4⁺) qui sont chargées d'activer d'autres cellules du système immunitaire. En fait, ces cellules T effectrices détectent les sites d'infection et migrent vers ces sites à partir du sang, alors que d'autres restent dans les tissus lymphoïdes afin d'activer

les lymphocytes B. Suite à l'activation des lymphocytes T naïfs, environ 5 jours sont nécessaires avant que l'expansion clonale ait lieu et les lymphocytes naïfs deviennent effecteurs, ce qui explique pourquoi la réponse immunitaire adaptative primaire prend un peu plus du temps à se développer. Après l'élimination de l'antigène, la plupart de ces lymphocytes générés vont mourir par la mort cellulaire programmée (apoptose), mais un petit nombre de lymphocytes T (5-10%) vont persister. Cette petite population de cellules spécifiques à un antigène donné sont appelées cellules mémoires et vont survivre afin d'assurer le déclenchement d'une réponse immunitaire secondaire plus rapide et plus efficace suite à une deuxième rencontre avec le même antigène en assurant ainsi une protection immunitaire permanente (*Janeway, et al, 2009*).

1.4.3. Reconnaissance et la présentation antigénique

Pour détecter et détruire les pathogènes internes ou externes, la défense de l'hôte a besoin de plusieurs stratégies de reconnaissance ainsi que de plusieurs mécanismes afin de répondre efficacement. En fait, la détection et la reconnaissance d'un antigène étranger par les lymphocytes se fait dépendamment du type de pathogène à être détecté, extracellulaire ou intracellulaire.

Les lymphocytes T expriment des récepteurs à leur surface qui peuvent reconnaître des fragments peptidiques en provenance de pathogènes intracellulaires qui sont dégradés à l'intérieur de la cellule. Ces fragments peptidiques sont pris en charge, transportés et exposés à la surface cellulaire par les molécules du CMH des cellules présentatrices d'antigène. Il existe deux types de molécules du CMH, à savoir CMH de classe I et CMH de classe II. (*Wang, J.H., et al, 2002*). Les deux classes des molécules du CMH diffèrent par l'origine des peptides antigéniques captés et transportés à la surface cellulaire. Les molécules de CMH de classe I captent des peptides en provenance des protéines synthétisées dans le cytosol comme les protéines virales par exemple, alors que les molécules du CMH de classe II lient les peptides en provenance d'antigènes exogènes. De plus, la reconnaissance de deux classes de molécules de CMH se fait par différents types de cellules T. Le corécepteur CD8 de cellules T lie sélectivement les molécules de CMH de classe I, alors CD4 lie de façon préférentielle les molécules de CMH classe II (*Bouvier, M., 2003; Fremont, D.H., et al, 1992*).

Les molécules de CMH de classe I sont exprimées par toutes les cellules donc toutes les cellules infectées par un virus seront reconnues et tuées par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Les molécules du CMH de classe II sont exprimées par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B qui, en fait, vont être activées par les cellules T CD4.

Les macrophages sont capables d'ingérer les antigènes comme les bactéries et présenter à la surface cellulaire à l'aide des molécules de CMH classe II et par conséquent d'acquérir une activité stimulatrice. Les cellules B elles-mêmes, possèdent une capacité unique de capter et d'internaliser les antigènes solubles de nature protéique et présenter les peptides à l'aide des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité en activant ainsi les cellules T. En effet, une réponse immunitaire adaptative sera déclenchée dans les organes lymphoïdes périphériques lorsque les cellules T naïves vont entrer en contact avec les cellules présentatrices d'antigène matures et activées, présentant les antigènes spécifiques sous forme peptidique à l'aide des molécules du CMH (*Smith-Garvin, J. E., et al, 2009; Davis, M. M., et al, 1998; Hennecke, J., et al, 2002; Luz, J.G., et al, 2002; Van Endert, P., 2006*).

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques jouent un rôle crucial et sont à la base d'une défense immunitaire de l'organisme vis-à-vis des cellules malignes et des agents pathogènes. Ils reconnaissent et éliminent les cellules présentant des fragments peptidiques issus de pathogènes ou de protéines associées à une transformation maligne, et considérés comme antigènes étrangers par l'organisme. Cette surveillance immunitaire est rendue possible grâce à un système d'apprêtement (*processing*) des protéines cellulaires, fournissant des peptides aux molécules de CMH de classe I exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes. Un élément clé du métabolisme des protéines cellulaires est le protéasome, la principale protéase du cytosol. Le protéasome étant une protéase multicatalytique, sa fonction est de dégrader des antigènes, ainsi que plusieurs protéines de type chaperon du réticulum endoplasmique (RE), ayant pour rôle d'assurer le repliement correct des molécules de classe I. Ce processus ne concerne pas uniquement les protéines cytosoliques. En fait, le protéasome est capable de dégrader des protéines en produisant des fragments d'une longueur allant de 4 à 15 résidus. Un grand nombre de protéines mal repliées ou mal assemblées dans le RE sont expulsées dans le cytosol pour y être aussi dégradées. En fait, l'appareil protéolytique du cytosol ne fait pas la différence entre les protéines issues de pathogènes infectant la cellule et les protéines qui sont codées par le génome cellulaire. Les deux types de protéines sont traités comme « endogènes

». La très grande majorité des peptides produits par le protéasome sont décomposés en acides aminés recyclés pour la synthèse de protéines (*Van Endert, P., 2006*). Généralement, les peptides présentés par les molécules du CMH de classe I sont issus de la dégradation des protéines endogènes qui sont synthétisées par la cellule présentatrice d'antigènes. Toutefois, les cellules dendritiques, qui sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, peuvent activer une voie de « processing » supplémentaire, permettant de présenter aussi des antigènes internalisés, appelée la présentation croisée, (ou cross-presentation). Celle-ci permet la dégradation des antigènes et assure le transport et assemblage des peptides issus de dégradation avec les molécules du CMH-I (*Van Endert, P., 2006*).

Les cellules T naïves repassent constamment par les organes lymphoïdes afin de détecter les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) en provenance de différents sites d'infection. Dès qu'un lymphocyte T CD4 ou CD8 mature et naïve rencontre une cellule présentatrice d'antigène qui présente le ligand approprié peptide/CMH, ça mène à l'induction de réponses des cellules T. L'activation et la différenciation des cellules T CD8 naïves mène à la génération des lymphocytes T cytotoxiques qui peuvent éliminer directement les cellules infectées par un pathogène, alors que les lymphocytes T CD4 se développent selon les signaux reçus lors de l'activation et la différenciation des cellules T CD4 naïves. De plus, ce ne sont pas toutes les rencontres entre les cellules T naïves et les cellules présentatrices d'antigènes qui mènent à l'activation, la prolifération et la différenciation de lymphocytes T, car trois signaux différents sont requis (*Smith-Garvin, J. E., et al, 2009*).

L'interaction spécifique entre le complexe TCR/CD3 présent à la surface des lymphocytes T et le complexe CMH/peptide présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène mène à la génération du premier signal. Lorsqu'une cellule T naïve rencontre une CPA exprimant le complexe CMH/peptide auquel elle se lie, cela mène à l'initiation de son activation. Cette interaction entre les TCR/CD3 et CMH/peptide donne un signal spécifique puisque seuls les lymphocytes T présentant un TCR donné seront activés. Une réorganisation du cytosquelette permettra la formation d'une zone de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène appelée la synapse immunologique. L'issue de l'activation de lymphocyte T dépendra de l'organisation des molécules de signalisation dans la synapse immunologique. De plus, l'affinité d'un TCR pour un complexe CMH/peptide est faible, mais d'autres molécules vont également intervenir dont l'ensemble de ces molécules permet

l'augmentation et la stabilisation de l'interaction entre les lymphocytes T et les CPA. Les corécepteurs CD4 et CD8 stabilisent l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide en liant les molécules de CMH-II et CMH-I respectivement. La transduction du signal est encore améliorée par des interactions entre les molécules d'adhésion et leur ligand (par exemple LFA-a/ICAM-I), ce qui mène à la prolongation du temps du contact entre les CPA et lymphocytes T (*Kindt, T.J. et al, 2008*).

Cependant, le premier signal n'est pas suffisant pour une activation complète des lymphocytes T. Le deuxième signal nécessaire pour l'activation et la prolifération des cellules T fait appel aux interactions entre les molécules co-stimulatrices exprimées à la surface de lymphocytes T (comme CD28) et leurs ligands exprimés à la surface de CPA (comme CD80/CD86). Alors, la co-stimulation est requise afin de stabiliser l'interaction entre le lymphocyte T et la CPA et d'assurer une activation complète des lymphocytes, et prévient ainsi un état d'anergie ou d'apoptose des lymphocytes T.

Le signal délivré par les voies de co-stimulation peut être de deux types, soit un signal activateur qui contribue à l'activation complète des cellules, ou inversement, qui pourrait correspondre à un signal de type inhibiteur impliqué dans un phénomène de régulation de l'activation cellulaire. Un bon exemple de type activateur est l'activation induite par la molécule CD28 exprimée à la surface du lymphocyte T, et le signal d'inhibition délivré par la molécule CTLA-4 également exprimée par le lymphocyte T. En fait, les deux protéines CD28 et CTLA4 lient le même ligand (CD80 et CD86) exprimé à la surface des CPA dépendamment du signal reçu, activateur ou inhibiteur. Les molécules des voies de co-stimulation sont exprimées par les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T et B, les CPA et les monocytes, soit après activation, ou de façon constitutive (*Smith-Garvin, J. E., et al, 2009, Kindt, T.J. et al, 2008*). Alors, la costimulation est importante aussi pour l'induction de la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices ou mémoires et va contribuer à une réponse lymphocytaire lors de la phase d'amplification de la réponse immunitaire avec la coopération entre les lymphocytes T et B en permettant une coopération cellulaire bidirectionnelle (*Smith-Garvin, J. E., et al, 2009*). La molécule CD28 est une molécule de costimulation « positive » car elle augmente la signalisation du TCR, et CTLA4 est une molécule de costimulation « négative » car elle est impliquée dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Effectivement,

l'expression et l'activation de ces molécules co-stimulatrices doivent être hautement régulées afin d'empêcher une prolifération incontrôlée des lymphocytes ou un épuisement.

Finalement, les cytokines solubles produites à la fois soit par les cellules T elles-mêmes ou par les cellules présentatrice d'antigène fournissent le troisième signal requis pour une activation complète des lymphocytes T. Les cytokines lient leurs récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T en activant une cascade de signalisation intracellulaire agissant à la fois sur la prolifération et/ou la survie cellulaire. L'interleukine-2 (IL-2) en est un exemple. La transcription des gènes de l'IL-2 et de la chaîne alpha du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (CD25) est induite par les signaux de co-stimulation menant à l'accroissement de la production de l'IL-2 par les cellules T activées. La sécrétion d'IL-2 et la liaison à son récepteur induisent une forte prolifération des cellules T naïves activées (*Kindt, T.J. et al, 2008*)

1.4.4. Les molécules de co-stimulation impliquées dans la survie des lymphocytes

L'activation du système immunitaire est hautement régulée par les signaux positifs ou négatifs en provenance de certains récepteurs exprimés à la surface des cellules du système immunitaire. Les molécules co-stimulatrices positives sont impliquées dans l'amplification du signal, l'activation et la régulation de la survie des lymphocytes, alors que les molécules co-inhibitrices diminuent ou empêchent l'activation. Les couples récepteur/ligand co-stimulateur ou co-inhibiteur appartiennent soit à la famille des immunoglobulines, soit à la superfamille de TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) /TNFRL (Tumor Necrosis Factor Ligand).

Les molécules co-stimulatrices les plus étudiées appartenant à la famille B7 sont CD28/B7-1(CD80), B7-2(CD86). En fait, la voie de co-stimulation la mieux connue, et dont le rôle dans l'activation lymphocytaire est bien établi, est la voie CD28 / B7-1, B7-2. Les molécules CD28 sont exprimées par les lymphocytes T et leurs interactions avec les molécules membres de la famille B7 exprimées à la surface de CPA, soit B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) après le premier signal d'activation, seront responsables du déclenchement du deuxième signal. Cet événement mènera à la synthèse et à l'accumulation intracellulaire des facteurs de transcription AP-1, NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et NF- κ B, promouvant la production du facteur de croissance des cellules T, l'interleukine 2 (IL-2) et d'autres cytokines, ainsi qu'à la division cellulaire et la prolifération des lymphocytes (*Olive, D., 2006*). La

molécule CD28 exprimée à la surface des lymphocytes T partage ces ligands CD80 et CD86 exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes avec la molécule CTLA4. En effet les ligands CD80 et CD86 peuvent lier CD28 et CTLA4, mais avec des affinités différentes. La molécule CTLA4 n'est pas exprimée à la surface des cellules au repos, mais son expression est induite par l'activation du TCR. Elle entre en compétition pour la liaison de ces ligands CD80 et CD86 avec CD28, mais CTLA4 possède une affinité plus importante que CD28.

Les exemples des couples récepteur/ligand co-stimulateurs appartiennent à la superfamille de TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) /TNFRL (Tumor Necrosis Factor Ligand) sont les couples récepteur/ligand comme CD40/CD40L(CD154), OX40(CD134) /OX40L, 4-1BB(CD137) / 4-1BBL(CD137L), CD27 / CD70 et d'autres (*Olive, D., 2006 ; Cannons, J.L., et al, 2001*).

L'une des voies bien étudiées est la voie de CD40/CD40L(CD154). CD40L est une glycoprotéine membranaire principalement exprimée sur les cellules T CD4⁺ rapidement après l'activation via le TCR, alors que CD40 est exprimé de façon constitutive à la surface des lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques. L'expression de CD40L est régulée par la liaison du TCR à l'antigène et par d'autres molécules de co-stimulation, notamment le CD28. L'issue de l'interaction entre CD40L exprimé à la surface des lymphocytes T et son récepteur CD40, exprimé à la surface des CPA, est à l'origine d'un signal d'activation des lymphocytes et cette interaction mène à l'induction de fonctions effectrices telles que la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigène, la régulation de l'expression des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, la différenciation de cellules B ainsi qu'à la conversion (*switch*) des immunoglobulines et la formation des cellules B mémoires (*Elgueta, R., et al, 2009*).

Un autre membre de la famille de TNF est le récepteur 4-1BB(CD137) qui est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés (*Cannons, J.L., et al, 2001*), mais aussi par les lymphocytes B humaines (*Zhang, X., et al, 2010*), les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK. Son ligand, CD137L (ou 4-1BBL), est retrouvé à la surface des CPA, après l'activation cellulaire. Effectivement, ils sont impliqués dans des signaux des types activateurs en association avec CD28 ou indépendamment de CD28, et coopèrent de manière séquentielle dans les différentes étapes de l'activation des lymphocytes. En réalité, ces différentes voies co-stimulatrices montrent des niveaux d'expression variés et possèdent des effets différents sur

l'activation des lymphocytes. Cependant, le dysfonctionnement des voies co-stimulatrices peut favoriser différentes pathologies comme les maladies auto-immunes, les infections ainsi que le développement de tumeurs. En fait, ce dysfonctionnement des voies co-stimulatrices mène à un déséquilibre qui peut résulter de différents mécanismes ; par l'expression anormale de façon constitutive des molécules co-stimulatrices sur certaines cellules qui normalement ne les expriment pas, ou par l'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation ayant une fonction inhibitrice. De plus, ce déséquilibre peut résulter d'une augmentation de l'expression des molécules qui vont favoriser la réponse immunitaire (*Elgueta, R., et al, 2009*).

En réalité, les connaissances sur l'implication des certaines voies co-stimulatrices dans certaines pathologies comme le cancer sont très limitées. Alors, il est important de connaître l'implication des voies de co-stimulation dans la régulation des réponses des cellules T afin de développer de nouvelles stratégies basées sur l'immunothérapie qui visent à renforcer l'immunité anti-tumorale en bloquant les voies inhibitrices, telle CTLA-4/ B7 ou PD-1/PD-L1, et/ou en stimulant les voies co-stimulatrices comme CD40L/CD40, 4-1BB/4-1BBL ou OX40/OX40L (*Olive, D., 2006*). Plus encore, certaines cascades menant à la survie des lymphocytes pourraient être impliquées dans la survie des cellules malignes si elles sont activées de façon constitutive, et il est essentiel de les comprendre, car cette connaissance va permettre la modulation de certaines molécules aidant ainsi à un bon fonctionnement du système immunitaire et à l'élimination des cellules tumorales.

1.5. Les TNFRs et leur rôle dans la survie cellulaire

1.5.1. Les TNFRs (Tumor Necrosis Factor Receptors)

Les TNFRs font partie d'une famille de récepteurs impliqués dans la transmission des signaux menant à la survie ou la mort des lymphocytes (*Figure 9*). L'équilibre entre les signaux de survie et la mort des lymphocytes joue un rôle critique dans l'issue de la réponse immunitaire. Les TNFRs se caractérisent par une large distribution dans les tissus et régulent diverses fonctions biologiques, notamment les réponses immunitaires, l'inflammation, le développement des organes lymphoïdes et du cerveau, ainsi que l'homéostasie tissulaire. La structure intracellulaire des TNFRs permet de les diviser en deux groupes. Le premier groupe de récepteurs est connu sous le nom des récepteurs de la mort cellulaire. Ces derniers contiennent un domaine de mort dans la région intracellulaire comme par exemple TNFR1, TNFR2, Fas(CD95), TRAIL-R1, R2 and R3 et d'autres. Par contre, les TNFRs qui se retrouvent dans le deuxième groupe n'ont pas un domaine de mort, mais contiennent des motifs d'interaction avec des TRAF (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor) dans leur région intracellulaire et sont impliqués dans la survie cellulaire. Les récepteurs comme CD40, OX40, CD27, CD30 et CD137 (4-1BB) sont un exemple pour le deuxième groupe de TNFRs. Ces récepteurs sont tous des molécules co-stimulatrices et agissent à des différentes étapes dans l'activation de lymphocytes T et B afin de moduler la réponse immunitaire. De plus, TNFR2 est aussi capable de lier les TRAFs et induire ainsi un signal de survie (*Ha, H., et al, 2009; Muppidi, J.R., 2004; Twohig, J.P., 2011*).

Les récepteurs de cette famille n'ont pas l'activité kinase et leur activation dépend de la liaison de protéines adaptatrices comme TRAFs pour assembler des complexes de signalisation en aval afin d'activer les différentes cascades importantes (*Figure 10*). La liaison de TRAFs à des TNFRs induit généralement l'activation des cascades de signalisation menant à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B et MAPKs, incluant ERK, p38 et JNK, impliquées dans la régulation de la survie cellulaire. De plus, les TNFRs jouent un rôle critique dans le destin des cellules T effectrices ainsi que dans le maintien de cellules T mémoires. En effet, la prolifération et la survie des cellules immunitaires sont hautement contrôlées à chaque étape de la réponse

immunitaire afin de garder l'homéostasie du système immunitaire (Elgueta, R., et al, 2009; Xie, P., 2013).

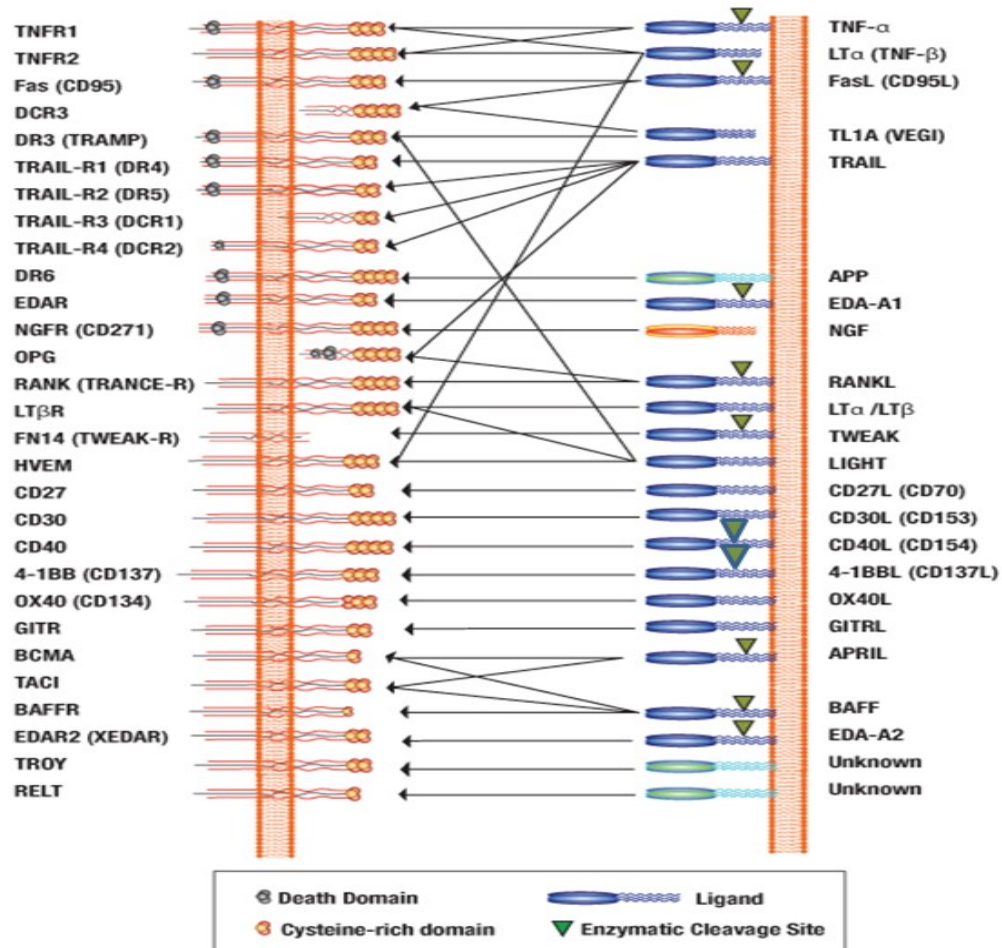


Figure 9. La famille TNFR/TNF-L. La superfamille des TNF comprend 32 récepteurs et 19 ligands (solubles et membranaires). Les récepteurs et les ligands de la famille TNF sont impliqués dans la régulation des réponses cellulaires, y compris l'activation, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. La signalisation du TNF est également impliquée dans la tumorigenèse, le rejet de greffe, la réplication du virus, et d'autres maladies ce qui conduit à l'apparition de nombreux TNF cibles thérapeutiques pour le cancer et maladies auto-immunes (modifié d'Aggarwal, B.B. et al, 2003).

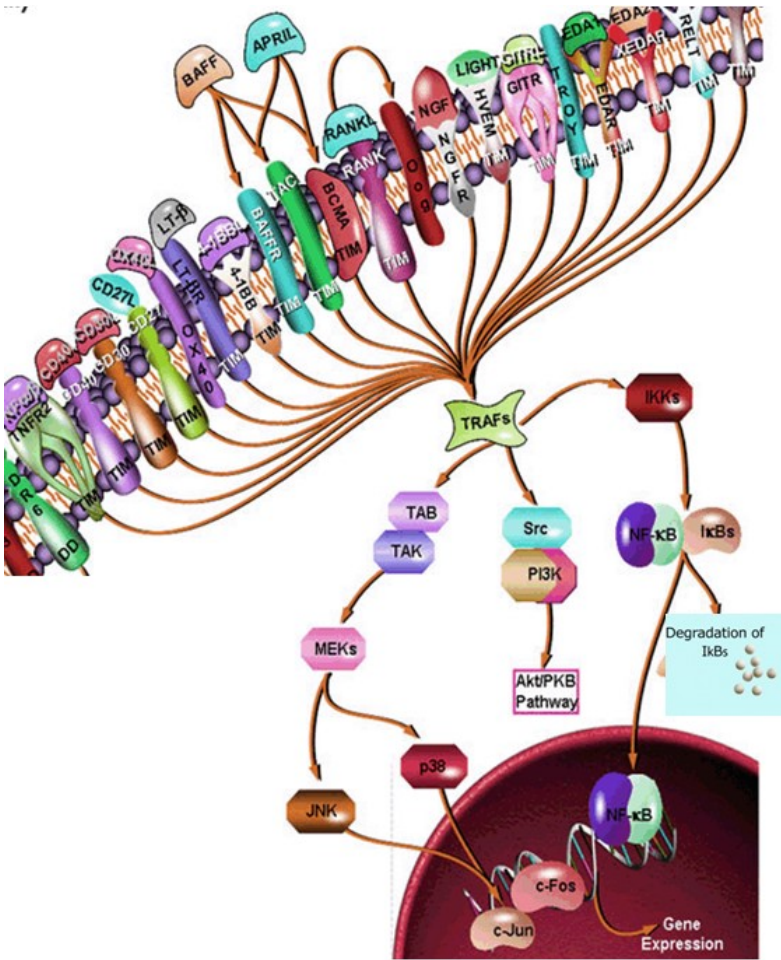


Figure 10. Les cascades de signalisations des TNFRs dépendantes de TRAFs (Tumor Necrosis Receptor Associated Factor). Les récepteurs de la superfamille de TNFR jouent un rôle essentiel dans des nombreux événements biologiques. L'engagement des récepteurs spécifiques de la famille TNFR par les ligands TNF-L correspondants provoque le recrutement des protéines adaptatrices intracellulaires TRAFs qui activent de multiples voies de transduction du signal. Chez l'homme, 29 membres de la famille des récepteurs du TNF ont été identifiés. Les TNFR2, CD40, CD30, CD27, TNFR2-RP, LT-BetaR, OX40(CD134), 4-1BB(CD137), BAFFR, BCMA, TACI, RANK, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), GITR et autres contiennent un ou plus TIM (TRAF Interacting Motifs) dans leurs queues cytoplasmiques. L'activation de récepteurs TNFR contenant motifs TIM conduit au recrutement de membres de la famille TRAF, et l'activation de multiples voies de transduction du signal telles que NF-KappaB (Nuclear Factor-Kappa B), p38, ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), JNK (Jun N-terminal Kinase) et PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). TRAFs sont une famille de protéines adaptatrices intracellulaires qui se lient directement ou indirectement à de nombreux membres de la superfamille de TNFR et peuvent induire l'activation des plusieurs cascades kinases qui conduisent finalement à l'activation des voies de transduction de signaux, tels que NF-κB, JNK, ERK, p38 et PI3K, ce qui mène à l'activation des différents processus cellulaires allant de la prolifération et la différenciation cellulaire ou à l'apoptose (Modifié de Qiagen).

1.5.2. Le récepteur 4-1BB (CD137) et son rôle dans la survie cellulaire

Parmi les membres de la superfamille TNFRs, 4-1BB (CD137, tnfrsf9), un récepteur inductible à la surface des cellules T est un médiateur important impliqué dans la survie cellulaire. 4-1BB est également un régulateur hautement important pour les réponses antivirales de cellules T CD8⁺. Le récepteur 4-1BB existe à la fois en tant que monomère de 30 kDa et de 55 kDa sous la forme de dimère (Vinay, D.S. et al, 2014).

Le récepteur 4-1BB a été découvert dans les années 80 à la surface des cellules activées. Il est exprimé par multiples cellules des lignées myéloïde et lymphoïde incluant les cellules activées T CD8⁺ effectrices, T CD4⁺, les cellules NK (Natural killer cells), les cellules NK/T, les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles (Yi, L. et al, 2014). Cependant, des études ultérieures ont montré que le récepteur 4-1BB est constitutivement exprimé à la surface d'un certain nombre de cellules, mais à de faibles niveaux, y compris cellules Foxp3⁺ Treg, cellules dendritiques (DCs) et les neutrophiles. Le récepteur est maintenant reconnu comme étant exprimé sur un spectre de cellules beaucoup plus large, notamment, les cellules T CD8⁺, T CD4⁺ (Cannons, J.L., et al, 2001), cellules B humaines (Zhang, X., et al, 2010), cellules T régulatrices (Treg) (Zheng, G. et al, 2004), cellules dendritiques (DCs) (Choi, B.K., et al, 2009), les monocytes, les neutrophiles (Nguyen, Q.T., et al, 2013), les cellules NK activées (Natural Killer cells) et les cellules NKT (Natural Killer T cells) (Baessler, T., et al, 2010; Marvel, J., et al, 2010).

Dans une étude faite chez la souris, les auteurs démontrent que la signalisation en aval du récepteur 4-1BB n'est pas impliquée dans la maturation des cellules dendritiques et n'influence pas l'expression des molécules impliquées dans la présentation antigénique, mais qu'elle est très importante pour leur survie. Dans ces travaux, les auteurs démontrent que les cellules dendritiques en provenance d'une souris 4-1BB^{-/-} subissent une maturation normale, mais après la maturation, se caractérisent par un niveau de survie très faible comparé aux cellules dendritiques en provenance d'une souris 4-1BB^{+/+} dû à la faible expression des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L en absence de 4-1BB. De plus, dans ses études *in vivo*, ils démontrent que la déficience de 4-1BB dans les cellules dendritiques mène à une diminution de l'expansion clonale des cellules T CD4⁺ antigène-spécifiques ainsi qu'à la formation des cellules T mémoires (Choi, B.K., et al, 2009).

Il est à noter que des études récentes ont démontré que le récepteur 4-1BB est aussi exprimé à la surface des lymphocytes B humains suite à une stimulation via le BCR et CD40 (α -CD40/ α -Ig) et que cette expression favorise la prolifération et la survie des lymphocytes B humaines (Zhang, X., et al, 2010). Par contre, une telle stimulation n'amène pas à l'induction de l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B murines, mais plutôt à l'expression de son ligand physiologique 4-1BBL (Futagawa, T., et al, 2002).

La stimulation du récepteur 4-1BB par son ligand naturel ou par des anticorps agonistes anti-4-1BB améliore l'activation de certaines cellules du système immunitaire incluant lymphocytes T, lymphocytes B humains, cellules dendritiques, les monocytes et les neutrophiles. De plus, la signalisation via 4-1BB mène à la co-stimulation des cellules T d'une manière CD28 indépendant (Saoulli, K., and al, 1998).

1.5.3. Le rôle des interactions 4-1BB/4-1BBL dans la survie de lymphocytes T

Le récepteur 4-1BB n'est pas exprimé à la surface des cellules T non activées, mais il est induit suite à l'activation des cellules. *In vivo*, le récepteur 4-1BB est exprimé d'une façon transitoire similairement au marqueur de l'activation précoce CD69. Il est à noter que, les études faites sur les cellules T *in vitro* ont démontrés que l'expression du récepteur 4-1BB peut être induite en absence de l'antigène est en présence des interleukines IL-2 et IL-15 dans les cellules T CD8⁺ mémoires, mais non pas dans les cellules T CD8⁺ naïves. L'induction de l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules T CD8 mémoires contribue à leur survie après la clairance de l'antigène (Wang, C., et al, 2009; Pulle, G., et al, 2006).

Dans une étude (Pepa, D. et al, 2013) il a été reporté que l'infection par le virus d'hépatite B mène à l'épuisement des lymphocytes T CD8 spécifiques au virus. Il a été démontré que les cellules NK sont capables de limiter ou inverser les réponses antivirales par une suppression ou l'inhibition des cellules T CD8⁺ spécifiques au virus. En réalité, différentes études ont été faites afin de bien comprendre les mécanismes impliqués dans la survie des lymphocytes T CD8⁺ dans le but de pouvoir restaurer la population indispensable pour la clairance virale. Une étude a démontré qu'avec un blocage des interactions PD-1/PD-L1, il est possible de récupérer les cellules T CD8⁺ spécifiques au HBV montrées être épuisées par le

virus (Fisicaro, P., et al, 2010). Plus encore, avec la combinaison d'une stimulation anti-4-1BB il est possible de restaurer la population des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au HBV, une population cellulaire très importante impliquée dans la clairance virale efficace (Fisicaro, P., et al, 2012).

Différentes études montrent, que le système immunitaire utilise les couples des molécules inductibles, comme le couple 4-1BB/4-1BBL afin de réguler la durée de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ en réponse à des infections qui prennent plus de temps pour éliminer l'antigène persistant (Wang, C., et al, 2009). De plus, certaines études (Cannons J.L. et al, 2001) ont démontré que la stimulation des cellules T par 4-1BBL joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'activation de la fonction effectrice et la survie cellulaire.

L'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules T est dépendante de l'activation et de l'interaction avec 4-1BBL, exprimé par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). De plus, l'activation d'un certain nombre d'agonistes, tels que les cytokines (IL-2, IL-4), les activateurs polyclonaux (Con A et PHA) et les molécules de la surface cellulaire (CD3 et CD28), améliorent encore l'expression de 4-1BB à la surface des lymphocytes T (Vinay, D.S., et al, 2014; Wang, C., et al, 2009). L'engagement du récepteur 4-1BB améliore la prolifération des lymphocytes T, l'activation de leur fonction effectrice, leurs survie et établit la mémoire immunologique (Sabbagh, L. et al, 2006) (Zhu, Y., et al, 2007). En effet, le récepteur 4-1BB est une molécule co-stimulatrice qui prolonge la survie de lymphocytes T CD8⁺ et favorise la réponse des cellules T par l'activation de PI-3-kinase et Akt/PKB menant ainsi à l'augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-x_L et Bfl-1 (Lee, HW. Et al, 2002). La signalisation en aval du récepteur 4-1BB joue un rôle critique dans la prévention de l'induction de la mort cellulaire et l'amélioration de la fonction T cytotoxique ainsi qu'à la production de l'IFN γ (interféron gamma) (Hurtado, J.C., et al, 1997 ; Shuford, W.W., et al, 1997). Dans une étude précédente, il a été démontré dans le modèle murin que, l'engagement du récepteur 4-1BB est impliqué dans la régulation négative de la molécule pro-apoptotique Bim promouvant la survie des lymphocytes T CD8 mémoires (Sabbagh, L., et al, 2006).

Dans certaines études *in vitro*, il a été démontré, que 4-1BBL ou l'anticorps anti-4-1BB peut activer les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ de façon égale (Cannons, J.L., et al, 2001), quoique, dans d'autres modèles, le récepteur 4-1BB est montré d'être induit à un niveau plus élevé chez les lymphocytes T CD8⁺ (Wen, T., et al, 2002). Bien que le récepteur 4-1BB est reconnu d'être

impliqué dans la prolifération et la survie des lymphocytes T, paradoxalement, les cellules T en provenance des souris déficientes en 4-1BB (4-1BB^{-/-}) montrent une hyper prolifération et une diminution de la production des cytokines (IL-2 et IL-4) (Kwon, B.S., et al, 2002). De plus, une étude démontre que l'anticorps agonistique anti-4-1BB augmente les réponses antivirales et anti-tumorales des cellules T CD8⁺ alors que en même temps bloque les réponses des cellules B et cellules T CD4⁺ auto-réactives (Wang, C., et al, 2009).

Le ligand physiologique de 4-1BB, 4-1BBL (ou CD137L), membre de la famille TNF-Ligands, est une protéine inductible dans les CPA et les lymphocytes B activés. Non seulement il mène à la co-stimulation de cellules T via l'activation du récepteur 4-1BB, mais il passe aussi les signaux aux cellules présentatrices d'antigène induisant ainsi leur prolifération, prolongeant leur survie et mène à l'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Palma, C., et al, 2004). Par exemple, les cellules B murines expriment 4-1BBL suite à une stimulation α -CD40/ α -IgM (Futagawa, T., et al, 2002) et dans les macrophages 4-1BBL est induite par la présence de LPS (Lypopolysaccharide bactérienne) de manière TLR4 dépendante. Dans les macrophages, son expression est très rapide et transitoire avec un pic d'ARNm à 4h après la stimulation et revient au niveau basal 12 heures après. Dans les cellules B et les cellules dendritiques (DCs), l'expression de 4-1BBL est régulée par CD40. D'ailleurs, l'expression de 4-1BBL à la surface cellulaire diminue en présence de son récepteur et est sujet du clivage par les métalloprotéinases (Salih, H. R. et al, 2001). La forme soluble de 4-1BBL peut être détectée dans plusieurs états pathologiques (Wang, C., et al, 2009; DeBenedette, M.A., et al, 1997; Salih, H. R. et al, 2001). En effet, 4-1BBL joue un rôle très important dans la génération d'une réponse T CD8 antivirale (Tan, J.T., et al, 1999).

Le récepteur 4-1BB appartient au TNFRs qui ne possèdent pas le domaine de la mort (Death Domain) dans leur queue cytoplasmique, mais ils contiennent des motifs d'interaction avec des molécules adaptatrices TRAFs (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor). Suite à l'activation, le récepteur 4-1BB recrute les molécules adaptatrices comme TRAF1 et TRAF2 afin d'assembler des complexes en aval et activer les cascades des signalisations impliquées dans la survie cellulaire (Figure 11). Dans une étude il a été démontré que 4-1BB murin possède seulement deux sites de liaison de TRAFs dans sa queue cytoplasmique et est capable de recruter directement TRAF1 et TRAF2 comparé au récepteur humain montré d'être capable de recruter en plus le TRAF3 (Wang, C., et al, 2009, Jang, I.K. et al, 1998). Il est

intéressant de noter que récemment, *Yi, L. et al.* ont étudié le site de la liaison de 4-1BB sur 4-1BBL afin de comparer les CRDs (Cysteine Rich Domain) de 4-1BB murin et humain et de bien comprendre les CRDs impliqués dans la liaison entre 4-1BB et 4-1BBL. Les résultats de leur étude ont démontré que h4-1BBL (human 4-1BBL) peut lier m4-1BB (mouse 4-1BB), mais que m4-1BBL ne peut pas lier h4-1BB. De plus, ils ont démontré une différence entre les deux espèces indiquant que la liaison de 4-1BB de souris et 4-1BB humain à 4-1BBL implique des différentes CRDs. Dans la souris, 4-1BBL lie CRDII de 4-1BB, alors que 4-1BBL humain lie préférentiellement le CRDIII de 4-1BB (*Yi, L. et al, 2014*).

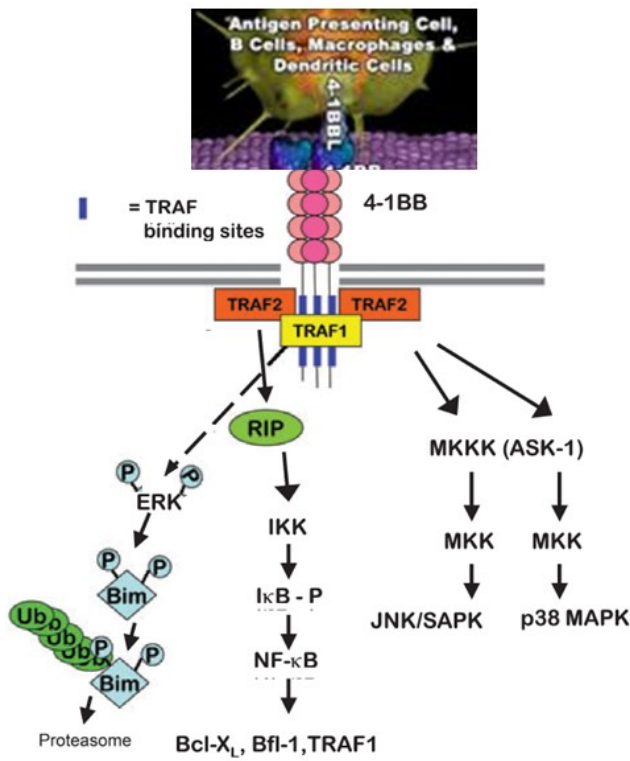


Figure 11. Transduction du signal par le récepteur 4-1BB dans les lymphocytes T. L'engagement du récepteur 4-1BB mène au recrutement de TRAF1 et TRAF2, résultant à l'activation des cascades du facteur nucléaire κ B (NF- κ B), ERK (Extracellular signal Regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), et p38 MAP kinase (mitogen-associated protein) favorisant la survie cellulaire. En l'absence de TRAF1, l'activation d'ERK est altérée et les niveaux de Bim augmentent dans la cellule. (Modifié de Wang, C. et al, 2009).

Les études effectuées dans des souris déficientes en CD28 (CD28^{-/-}) ont démontré que dans le cas d'une infection virale, une simple dose de l'anticorps agoniste anti-4-1BB corrige

l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ malgré la déficience en CD28 (Bertram, E.M., et al, 2004). Alors, les interactions 4-1BB/4-1BBL sont très importantes et peuvent contribuer à la programmation d'une réponse des lymphocytes T CD8⁺ lorsque les signaux CD28 sont limités dû à une déficience en CD28 ou à des niveaux faibles (Wang, C. et al, 2009; Laderach, D., et al, 2002; Chu, N.R., et al, 1997; Saoulli, K., et al, 1998). En effet, certains immunogènes activent faiblement le système immunitaire et génèrent une très faible réponse immunitaire primaire dans le but de limiter l'expression des molécules de la famille B7, comme le CD28, afin de limiter l'activation des cellules T. Donc, l'activation de la cascade en aval du récepteur 4-1BB par son ligand (4-1BBL) est requise pour une activation maximale des cellules T et peut mener à des changements épigénétiques qui vont contribuer à programmer les cellules T mémoires pour une deuxième expansion. De plus, l'activation de la cascade va jouer un rôle clé dans la maintenance des cellules T CD8⁺ mémoires (Sabbagh, L. et al, 2008). Dans le cas d'une infection virale sévère lorsque la charge virale persiste, 4-1BBL va soutenir l'expression du récepteur 4-1BB afin de maintenir la fonction cytotoxique de cellules T CD8⁺ au site de l'infection, menant ainsi à la clairance virale (Wang, C., et al, 2009).

1.5.4. Le rôle des interactions 4-1BB/4-1BBL dans la survie de lymphocytes B

En réalité, le récepteur 4-1BB a été beaucoup étudié concernant son rôle dans la survie de lymphocytes T, mais peu d'études ont été faites chez les cellules B. L'étude faite par (Zhang, X., et al, 2010) a démontré que contrairement aux cellules B murines qui n'expriment pas le récepteur 4-1BB (Futagawa, T., et al, 2002), le récepteur est exprimé à la surface de cellules B humaines suite à une stimulation via le BCR (anti-CD40/anti-Ig) et que cette stimulation favorise la prolifération et la survie des cellules B humaines. D'ailleurs, cette étude démontre que l'IL-4, IL-10 and IL-21 inhibent l'expression du récepteur. L'engagement du récepteur 4-1BB dans les lymphocytes B ne résulte pas en une augmentation de la production d'IL-4, -6, -10 ou l'IFN γ , mais la stimulation anti-4-1BB mène à une augmentation significative de la sécrétion de TNF α et β . Dans leur étude, les auteurs démontrent que le récepteur 4-1BB est exprimé préférentiellement, mais non exclusivement, par les cellules B naïves après une stimulation anti-CD40/anti-Ig. Ceci démontre que le récepteur est très important pour la régulation de cellules B humaines naïves car les cellules B naïves et mémoires ont besoin de

différents signaux pour l'activation et la différenciation (*Zhang, X., et al, 2010*). Par contre, aucune étude ne démontre les molécules de signalisation impliquées après l'engagement du récepteur 4-1BB dans les cellules B humaines.

1.6. Les molécules adaptatrices TRAFs (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor)

Les TRAFs sont reconnus comme des transducteurs du signal d'une grande variété d'autres familles de récepteurs, y compris les récepteurs immunitaires innés (Toll-like Receptors (TLRs), les NLRs (NOD-like receptors), les récepteurs immunitaires adaptatifs (les TNFRs), les récepteurs de cytokines et les récepteurs de lectines de type C (*Xie, P. 2013*). À l'exception de TRAF4, tous les membres de cette famille sont des protéines cytosoliques (*Bradley, J.R., 2001*) et leur expression est régulée de manière spécifique selon le type cellulaire (*Zapata, J.M., et al, 2000*).

Les TRAFs représentent une famille de protéines adaptatrices impliquées à la liaison entre les membres de la famille de TNFRs et les cascades de signalisation en aval. Cette famille de protéines intracellulaires lie directement la région cytoplasmique des récepteurs TNFRs et active différentes voies de signalisations intracellulaires. La famille est composée de sept membres distincts (*Figure 12*) (*Ha, H., et al, 2009; Wajant, H., et al, 2001*).

Il est à noter que certains virus et bactéries ont développés une variété de stratégies pour cibler ou détourner la formation de complexes de TRAFs afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et de promouvoir leur propre propagation ou la persistance. Le meilleur exemple est *Latent Membrane Protein 1* (LMP1) du virus d'Epstein-Barr, qui séquestre le TRAF3 cellulaire, et détourne TRAF1, 2, 5 et 6 pour imiter la signalisation de CD40 constitutivement activée. De plus, il existe des virus qui régulent l'expression des miARN (micro ARN) spécifiques pour cibler les TRAFs (*Mishra, R., et al, 2012*).

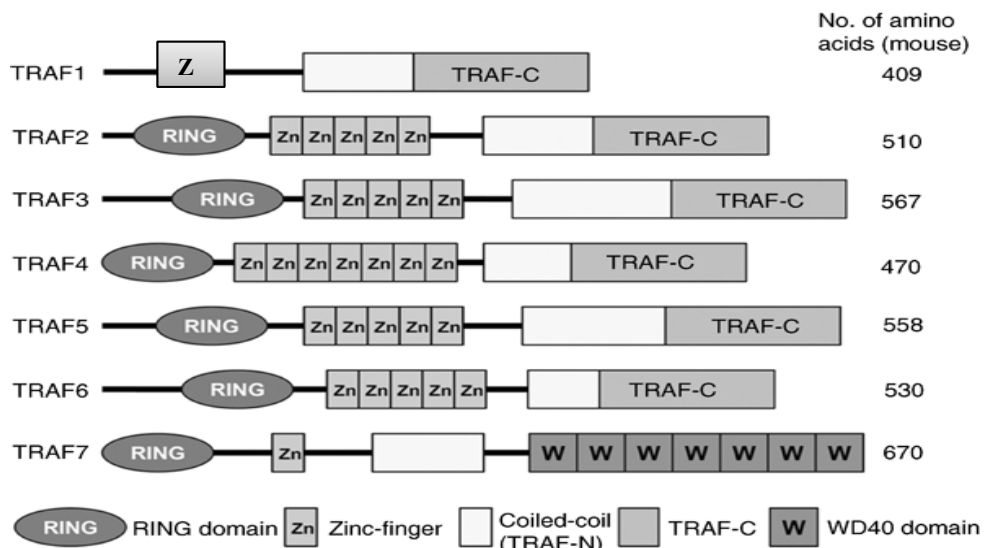


Figure 12. La représentation schématique de membres de la famille TRAFs. La famille est composée de sept membre distinctes, chacune contenant un domaine RING (sauf TRAF1), motifs doigt de zinc, un N-terminal du domaine TRAF et un C-terminal TRAF domaine. La moitié de la partie C-terminale du domaine TRAF (TRAF-C) est hautement conservée parmi les membres de la famille TRAF et permet l'homo- et hétérooligomérisation des TRAFs et l'association des TRAFs avec différents récepteurs de surface cellulaire, alors que la partie N-terminale du domaine TRAF (TRAF-N) est moins conservée (Modifié de Ha, et al, 2009).

Les TRAFs sont des protéines adaptatrices très importantes pour l'immunité de l'hôte, comme le démontre leur utilisation partagée par les récepteurs de l'immunité innée (comme les TLRs, NLRs, RLRs et les cytokines) et de l'immunité adaptative (comme CD40, BAFF-R, OX40, 4-1BB et TCR). Les voies de signalisation dépendantes de TRAFs mènent généralement à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B, des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), ou des facteurs de régulation de l'interféron (IRF). Agissant seul ou en combinaison, les TRAFs sont des régulateurs très polyvalents qui contrôlent divers processus cellulaires, y compris la prolifération, la survie, la différenciation, l'activation ainsi que la production de cytokines. En effet, une altération des fonctions de TRAFs peut contribuer à une pathologie menant à des maladies importantes comme le cancer, l'immunodéficience ainsi qu'à des maladies auto-immunes (Inoue, J., et al, 2000).

1.6.1. TRAF1 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 1)

Parmi les membres de la famille TRAF, TRAF1 est unique parce qu'elle ne possède pas de domaine RING trouvé dans la région N-terminale des autres TRAFs qui est nécessaire pour l'activation du facteur nucléaire NF- κ B, ainsi que pour le fait d'avoir seulement un doigt de Zn. En effet, TRAF1 était connue comme la forme dominante négative de TRAF2 (*Tsitsikov, E. et al, 2001*).

À la différence d'autres TRAFs, TRAF1 est une protéine inductible et est caractérisée par une expression très restreinte aux lymphocytes, cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales. Les analyses de différents tissus humaines en provenance des personnes saines ont révélé que les quantités les plus abondantes de TRAF1 sont détectées dans le thymus, la rate, les testicules et l'épiderme, comparé aux autres tissus où cette protéine est moins répandue (*Zapata, J.M. et al, 2000*). Parmi tous les membres de la famille TRAF, c'est l'expression de TRAF1 qui est la plus hautement régulée. Bien que dans la plupart des cellules l'expression de TRAF1 est très faible ou non détectable, son expression est rapidement induite en réponse à l'activation de NF- κ B et AP-1 par un large spectre de médiateurs inflammatoires comme TNF- α , CD40, LPS et d'autres (*Caprpentier, I., et al, 1999 ; Dunn, I., et al, 2000 ; Wang, C., et al, 1998 ; Schwenzler, R., et al, 1999*).

TRAF1 peut s'associer avec plusieurs membres de la famille TNFRs et peut également lier plusieurs protéines kinases et des protéines adaptatrices, ce qui suggère que cette protéine possède de multiples fonctions dans différentes voies de signalisation. TRAF1 est recrutée en réponse à la co-stimulation de plusieurs membres de la famille TNFRs notamment CD30, CD40, OX40, 4-1BB(CD137), LMP1 (Latent membrane protein1) et BCMA (B cell maturation protein) (*Bradley, J.R., 2001*). TRAF1 peut être recruté indirectement par TNFR1 et TNFR2 via TRAF2 et TRADD. Certaines études montrent qu'en aval de CD40, les effets de TRAF1 dépendent de la stœchiométrie de TRAF1 et TRAF2. En effet, en aval de CD40, TRAF1 est capable de maintenir JNK, l'activation de NF- κ B ainsi que de stabiliser TRAF2 par son relâchement de radeau lipidique et ainsi de le protéger de la dégradation (*Arron, JR. et al, 2002 ; Xie, P., et al, 2006*). Par contre, en aval de CD40, la surexpression de TRAF1 provoque l'inhibition de TRAF2 (*Fotin-Mleczeck, M., et al, 2004*). De façon similaire, TRAF1 est requis dans les cellules T afin de protéger TRAF2 de la dégradation suite à l'activation de la cascade

en aval du récepteur 4-1BB (*Sabbagh, L., et al, 2008*). Fait intéressant, TRAF1 a été toujours identifié avec TRAF2, cIAP1 et cIAP2 qui peuvent former un complexe protéique capable de bloquer directement la caspase 8 activée par TNFR1. En effet, TRAF1 lie le domaine BIR de protéines cIAPs (The cellular inhibitor of apoptosis), comme cIAP1 et cIAP2, et le complexe formé est impliqué dans l'inhibition de certaines caspases activant l'apoptose cellulaire (*Leo, E., et al, 2001*). Une étude a été faite (*Zheng, C., et al, 2010*) sur les interactions et la structure cristalline du complexe TRAF1/TRAF2/cIAP2. Selon cette étude, l'homo trimère de TRAF1 est capable simultanément de réagir avec trois molécules de cIAP2, mais avec une très faible affinité, comparé au TRAF2 trimérique. Par contre, le complexe hétéro trimérique formé TRAF1 : (TRAF2)₂ montre une affinité beaucoup plus élevée pour cIAP2 et la stœchiométrie de l'oligomère formé est suivante : TRAF1/ (TRAF2)₂ /cIAP2. En effet, l'hétéro trimère formé entre TRAF1 et deux TRAF2 possède une affinité beaucoup plus élevée pour cIAP2 comparé à l'homo trimère formé par trois TRAF2. De plus, le site de liaison de cIAP2 sur l'hétéro trimère TRAF1 : (TRAF2)₂ est composé d'une chaîne TRAF1 et une de TRAF2 et les analyses plus approfondies faites par la cristallographie démontrent que c'est le TRAF1 qui contribue avec les majorités de résidus dans les interactions avec cIAP2, et non TRAF2 (*Zheng, C., et al, 2010*). Ceci suggère que TRAF1 joue un rôle très important dans la régulation de la fonction de TRAF2 ainsi que dans la protection de sa dégradation. En effet, la perte de l'expression de TRAF1 en aval de CD40 mène à la dégradation de TRAF2 et TRAF3 dans les lignées cellulaires de nature B (*Wicovsky, A., et al, 2009 ; Wicovsky, A., et al, 2009 ; Xie, P., et al, 2006*). De plus, TRAF1, TRAF2, cIAP1 et cIAP2 sont tous nécessaires pour réprimer l'apoptose induite par TNF dans les lignées cellulaires déficientes en NF-κB (*Wang, C., et al, 1998*). Il semble que les interactions TRAF1/2 et cIAP1/2 jouent un rôle critique entre les signaux de survie et de la mort cellulaire. En effet, cIAP1/2 sont souvent surexprimées dans les différents cancers tout comme TRAF1/2 qui sont montrés surexprimés anormalement dans un large spectre de cancers impliquant les lymphocytes B (*Zheng, C., et al, 2010 ; Zapata, C., et al, 2000 ; Zapata, C. et al, 2007*). Il est à noter que certaines études ont démontré le rôle pro-apoptotique que TRAF1 peut jouer car il est la cible du clivage de différentes caspases, comme la caspase 8 par exemple, et le produit du clivage mène à l'inhibition du facteur nucléaire NF-κB, menant ainsi à la limitation de l'expression de TRAF1 lui-même. Effectivement, la caspase 8 clive TRAF1 en deux fragments TRAF1-C et TRAF1-N. La surexpression de fragment TRAF1-C, mais non de

TRAF1-N, mène à une augmentation de l'induction de l'apoptose induite par TNFR1 et Fas ligand (Henkler, F., et al, 2003 ; Irmeler, M., et al, 2000 ; Leo, E., et al, 2001).

Afin de bien comprendre le rôle de TRAF1, une souris TRAF1^{-/-} a été créée par Tsitsikov et al. (Tsitsikov EN. et al, 2001). Les analyses faites ont démontré que les souris déficientes en TRAF1 sont nées avec apparence normale, comparées aux souris TRAF2^{-/-} et TRAF3^{-/-} car les gènes de TRAF2 et TRAF3 sont impliqués dans la survie, leur déficience est létale et les souris TRAF2^{-/-} (Yeh, W.C., et al, 1997) et TRAF3^{-/-} (Xu, Y., et al, 1996) meurent prématurément. Par contre, les études plus approfondies (Tsitsikov, E.N., et al, 2001) ont révélé un développement normal de lymphocytes T et B dans la souris TRAF1^{-/-}, aucune différence dans le nombre des molécules de CD4, CD8, TCRαβ, TCRγδ et CD3 dans les thymocytes positives en provenance des souris WT et TRAF1^{-/-} et un nombre normal de lymphocytes B IgM⁺ dans la moelle osseuse, indiquant que l'expression de TRAF1 n'est pas requise pour le développement des lymphocytes T et B. De plus, l'étude sur la réponse proliférative de cellules B TRAF1^{-/-} suite à une stimulation α-IgM ou α-CD40 a démontré une prolifération normale de lymphocytes B, une activation normale de facteurs de transcriptions NF-κB et AP-1 après l'engagement de CD40 ainsi qu'une commutation isotypique d'immunoglobulines intacte dans les cellules B déficientes en TRAF1. En effet, dans cette étude il a été démontré que les réponses antigéniques spécifiques aux anticorps ne dépendent pas de TRAF1. Bien que le développement des lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes d'une souris TRAF1^{-/-} semble normal, de même la fonction de cellules B de cette souris, les lymphocytes T montrent une réponse hyper proliférative en réponse à une stimulation α-CD3 et TNF ce qui suggère que, normalement, TRAF1 est un inhibiteur de l'activation via TCR/CD3 (Tsitsikov, E.N., et al, 2001). En effet, la dérégulation de l'expression de TRAF1 peut mener à une hyper activation des lymphocytes ce qui peut contribuer à la formation des tumeurs lymphoïdes malignes. L'étude faite par Speiser, D.E. et al, a démontré que la surexpression de TRAF1 *in vivo* inhibe la suppression induite par l'antigène *in vivo* des cellules T CD8⁺ activées (Speiser, D.E. et al, 1997).

Le rôle important de TRAF1 dans la survie des cellules T CD8⁺ a été reporté dans plusieurs études. Dans une étude faite sur la dérégulation des cellules T CD8⁺ suite à une infection virale par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) ou le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) clone 13 chez la souris, il a été démontré qu'au cours de la phase chronique de l'infection, les cellules T CD8⁺ spécifiques au virus perdent

l'expression de TRAF1 car les niveaux de TRAF1 sont significativement plus faibles dans les cellules T CD8 spécifiques au VIH en provenance de patients avec une infection chronique par rapport aux patients infectés récemment ou des contrôleurs viraux (*Wang, C., et al, 2012*). De plus, cette étude démontre une corrélation négative entre TRAF1 et PD-1 (Programmed cell death protein 1) et la charge virale. Les études plus poussées ont été effectuées afin de mieux comprendre si la diminution de l'expression de TRAF1 pourrait jouer un rôle dans la perte de contrôle du VIH. L'expression de TRAF1 a été inhibée dans les cellules T CD8⁺ en provenance des contrôleurs du virus ou un donneur non infecté en utilisant des petits ARN d'interférence (siRNA) dirigé contre TRAF1 ou le contrôle de l'ARN et la fonction des cellules T CD8⁺ a été évaluée dans un essai de la suppression virale. Les résultats ont démontré que l'inhibition de TRAF1 mène à une augmentation de la fréquence des cellules T CD4 infectées par le VIH comparé au contrôle, à une diminution de la suppression virale dépendante de cellules T et d'une altération de réponses spécifiques au VIH des lymphocytes T CD8 en aval du récepteur de 4-1BB (*Wang, C., et al, 2012*). En plus, il a été démontré que la phase de l'infection chronique par le virus VIH est caractérisée par un dysfonctionnement du système immunitaire résultant de la perte post-transcriptionnelle d'un adaptateur de signalisation de cellule T spécifique du virus, la protéine TRAF1, menant ainsi à la désensibilisation de la voie co-stimulatrice du récepteur 4-1BB impliquée dans la survie des lymphocytes T (*Wang, C., et al, 2012*).

Les études précédentes faites chez les souris ont lié les effets de survie de TRAF1 dans les cellules T CD8⁺ à la modulation TRAF1-dépendante de la molécule pro-apoptotique Bim (*Sabbagh, L., et al, 2006 ; Wang, C., et al, 2007 ; Sabbagh, L., et al, 2008*). Bien que l'inhibition de TRAF1 dans les cellules T CD8⁺ spécifiques au virus de VIH mène à une perte de control viral par les cellules T CD8⁺ dans une infection par VIH *ex vivo*, une inhibition de Bim a un effet compensatoire (*Wang, C., et al, 2012*) confirmant ainsi les résultats des études précédentes (*Sabbagh, L., et al, 2006 ; Wang, C., et al, 2007 ; Sabbagh, L., et al, 2008*) de la liaison entre TRAF1 et la modulation de l'expression de la molécule pro-apoptotique Bim promouvant la survie des cellules T CD8⁺. D'ailleurs, un transfert adoptif des cellules T CD8 mémoires exprimant TRAF1 au stade chronique de l'infection virale mène à la réduction de la charge virale comparé aux cellules mémoires déficientes en TRAF1, indiquant ainsi le rôle important de TRAF1 dans le contrôle des infections virales dans les cellules T CD8⁺ spécifiques (*Wang, C., et al, 2012*). La perte de l'expression de TRAF1 a des conséquences fonctionnelles dans le

contrôle de la charge virale, menant ainsi au dysfonctionnement des cellules T CD8⁺, une expansion déficiente en réponse d'une stimulation α -4-1BB et leur épuisement en conséquence. En effet, les études plus approfondies ont démontré que le défaut de l'expression de TRAF1 ne vient pas d'un défaut des niveaux d'ARNm mais plutôt d'un défaut de niveaux de l'expression de la protéine, conséquence d'un contrôle négatif par le TGF β (Transforming growth factor beta) car un blocage de TGF β dans la phase chronique de l'infection virale mène à une augmentation de l'expression de TRAF1 *in vivo* (Wang, C., et al, 2012). Il est évident que TRAF1 joue un rôle clé dans la survie des lymphocytes T CD8⁺, donc il est très important de connaître les mécanismes qui maintiennent la survie des lymphocytes T CD8⁺ et les molécules impliquées dans les cascades de signalisation cellulaires. Plusieurs études ont été faites sur TRAF1 afin de bien comprendre la régulation de son expression, les cascades de signalisation dans lesquelles la protéine est impliquée, son rôle dans la survie et la mort cellulaire et la signification de la surexpression de ce membre de la famille TRAFs dans les différents cancers de nature de cellules B. Dans une étude précédente (Sabbagh, L., et al, 2006) il a été démontré le rôle clé de TRAF1 dans la survie des cellules T activées et les cellules T CD8 mémoires car que la déficience en TRAF1 dans les lymphocytes T CD8 mémoires a un effet important sur la survie de ces dernières en absence de l'antigène *in vivo*. Les détails de cette cascade de la signalisation menant à la survie cellulaire seront présentés dans la section 1.6.3.

1.6.2. Les signaux menant à l'induction de l'expression de TRAF1 dans les lymphocytes

L'expression de TRAF1 dans les lymphocytes peut être dynamiquement régulée avec des changements dans l'activation des lymphocytes. Dans une étude qui compare l'expression des molécules de la famille TRAFs dans les tissus normaux et maligns, il a été démontré que les lymphocytes T isolés à partir de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) des donneurs sains contiennent peu ou des niveaux non détectables des TRAFs (TRAF1, 2, 5, et 6). Une stimulation des cellules T avec l'anticorps monoclonal α -CD3 seul, ou en combinaison avec PHA (Phytohemagglutinin), ou IL-2 mène à l'augmentation de l'expression de TRAFs mentionnées plus haut. En effet, l'expression de TRAF1 peut être induite par plusieurs stimuli comme IL-1, TNF α , EBV (Epstein-Barr virus) (Durkop, H., et al, 1999). L'expression de

TRAFs a été évaluée aussi dans les cellules B du centre germinatif et les analyses ont démontrées que les cellules B humaines non stimulées, contiennent TRAF2, 3,5 et 6 mais non TRAF1. Par contre, TRAF1 est fortement inductible par le CD40L(CD154) et anti-IgM dans les cellules B humaines du centre germinatif en culture, alors que les niveaux d'expression de TRAF2, TRAF3, TRAF5, et TRAF6 demeurent relativement inchangés (*Zapata, J.M., et al, 2000*).

1.6.3. La voie de signalisation en aval du récepteur 4-1BB dépendante de TRAF1

4-1BB est un récepteur de liaison à TRAF1 très important pour la survie des cellules T CD8. Comme il a été mentionné, les études précédentes (*Sabbagh, L., et al, 2006*) ont démontré que TRAF1 est requis pour la survie et le maintien des cellules T CD8 en absence d'antigène *in vivo*. Selon cette étude, les cellules T spécifiques à l'antigène et déficientes en TRAF1 ont montré une récupération diminuée comparé à celle en provenance d'une souris WT (Wild Type). Les analyses plus poussées ont démontré que la protéine TRAF1 était requise pour les cellules T afin de réguler en aval les niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim, menant ainsi à la survie des cellules T CD8. En effet, l'activation et la régulation de TRAF1 et Bim ont un rôle très important dans la survie des cellules T CD8 mémoires (*Sabbagh, L., et al, 2006*). Dans les cellules T activées, le ratio de l'expression relative de la molécule pro-apoptotique Bim, membre de la famille des protéines BH3-only, et l'expression des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 and Bcl-x_L est un facteur déterminant critique pour leur survie. Dans les cellules, le niveau de la molécule pro-apoptotique Bim est régulé par la phosphorylation d'ERK. En effet Bim possède plusieurs sites qui peuvent être phosphorylés par ERK car l'activation d'ERK (sa phosphorylation) mène à la phosphorylation de Bim, provoquant ainsi sa dégradation par le protéasome (*Ley, R., et al, 2003*). En effet, dans l'étude précédent, le rôle de TRAF1 et ERK a été étudié dans la régulation de niveaux de Bim après l'engagement du récepteur 4-1BB dans un modèle de souris TCR transgénique (*Sabbagh, L. et al, 2008*). Dans ce modèle transgénique, les lymphocytes isolés à partir de la rate d'une souris en provenance des souris WT et TRAF1^{-/-} ont été stimulés avec leur peptide antigénique correspondant (peptide OVA-pour ovalbumine) afin de les activer via le complexe TCR. Puis, les lymphocytes T (splénocytes OT-I) ont été isolés et étudiés d'abord pour comparer l'expression du récepteur 4-1BB dans les deux types des souris WT et TRAF1^{-/-} afin de bien comprendre si la déficience en TRAF1 influence

l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules T. Les résultats ont démontré l'expression uniforme du récepteur 4-1BB dans les deux génotypes des souris ce qui a démontré que l'absence de TRAF1 n'influence pas l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules T après une stimulation via le TCR (*Sabbagh, L., et al, 2008*). Puis, les splénocytes OT-I activés ont été stimulés avec un anticorps anti-4-1BB. En effet, l'activation de la voie en aval du récepteur 4-1BB mène à l'augmentation de niveau de phosphorylation d'ERK après l'engagement du récepteur dans les cellules T en provenance de la souris WT. Puis, la phosphorylation d'ERK dans les cellules T en provenance de souris WT a été inhibée en utilisant un inhibiteur d'ERK démontrant ainsi l'implication du récepteur 4-1BB dans la phosphorylation d'ERK. En plus, il a été démontré que les lymphocytes activés OT-I en provenance d'une souris déficiente en TRAF1 ne sont pas capables d'activer ERK en réponse à une stimulation anti-4-1BB démontrant ainsi que TRAF1 est impliqué dans la liaison entre la phosphorylation d'ERK et la diminution de niveau de Bim (*Sabbagh, L., et al, 2008*). Alors, la signalisation en aval du récepteur 4-1BB menant à la régulation de Bim par l'intermédiaire de la phosphorylation d'ERK a été démontrée d'être TRAF1 dépendant (*Sabbagh, L., et al, 2008*).

En fait, lorsque les signaux TCR ainsi que la co-stimulation via le récepteur 4-1BB sont présents, TRAF1 joue un rôle prédominant comme un médiateur important de signaux de survie en aval du récepteur 4-1BB dans les cellules T activées. De plus, l'inhibition de l'expression de TRAF1 par siRNA dans les cellules T mène à l'augmentation de niveau de Bim et à la diminution de l'expansion cellulaire médiée par 4-1BBL (*Sabbagh, L. et al, 2006; Wang, C., et al, 2007*).

Il est peu connu sur les voies de signalisation TRAF1-dépendantes. Les études précédentes ont démontré des parties distinctes de la cascade TRAF1-dépendante après l'engagement du récepteur 4-1BB. (*Sabbagh, L., et al, 2006; Sabbagh, L., et al, 2008*) Par contre, aucune étude n'a démontré le mécanisme précis par lequel 4-1BB soutient la survie des cellules T CD8⁺ après le recrutement de TRAF1. En effet, le mécanisme par lequel TRAF1 lie ERK est peu clair, menant ainsi à la réduction des niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim après l'engagement du 4-1BB dans les lymphocytes T. Les études plus approfondies sont nécessaires afin de bien comprendre si TRAF1 agit seul dans l'activation d'ERK ou il y a d'autres partenaires de TRAF1 qui pourraient lier TRAF1 à la voie de la MAP kinase ERK en aval de 4-1BB.

1.6.4. L'implication du récepteur 4-1BB (CD137) et TRAF1 dans la survie des cellules malignes

Les lymphocytes jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire et la mémoire immunologique, donc il est très important de bien connaître les mécanismes contrôlant la survie des cellules saines et malignes afin de nous permettre de développer des stratégies efficaces basés sur l'immunothérapie. Une approche prometteuse est l'activation de molécules co-stimulatrices combinée avec le blocage des cascades co-inhibitrices afin d'améliorer l'immunité anti-tumorale (*Schaer, D.A., et al, 2014*).

Dans une étude (*Palma, C., et al, 2003*) faite sur l'expression du récepteur 4-1BB et son ligand physiologique 4-1BBL dans les différentes lignées leucémiques, il a été démontré que le récepteur et le ligand sont co-exprimés d'une façon constitutive à la surface des lignées leucémiques de nature T et B. De plus, l'expression constitutive de 4-1BB par les cellules leucémiques non stimulées B et T présentent quelques différences comparées aux cellules T leucémiques activées, exprimant 4-1BB après une stimulation. Selon cette étude, les cellules leucémiques de nature T et B expriment le récepteur et le ligand d'un faible niveau mais les deux molécules soit 4-1BB et 4-1BBL activent des cascades de signalisation menant à la prolifération et à la survie prolongée. De plus, l'activation du système 4-1BB/4-1BBL s'oppose aux effets cytotoxiques comme la fragmentation de l'ADN par des médicaments anticancéreux comme doxorubicine et camptothecin, favorisant ainsi la prolifération de cellules leucémique qui s'échappent de l'action de la drogue (*Palma, C., et al, 2003*). Alors, il est possible que les couples de molécules co-stimulatrices comme 4-1BB/4-1BBL puissent conférer un avantage aux cellules leucémiques promouvant la survie accrue, la croissance cellulaire et contribuent à la résistance pour les médicaments anticancéreux. Plus encore, il a été reporté que l'administration des médicaments anticancéreux comme la doxorubicin et la bleomycin à des concentrations subcytotoxiques mène à l'augmentation de l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules CEM (cellules T dérivées de la leucémie aigüe) activées et, en conséquence, à l'amplification des signaux anti-apoptotiques générées par le récepteur 4-1BB (*Kim, K-M., et al, 2002*). Une différence est aussi observée quant à l'expression de 4-1BBL entre l'expression par les cellules présentatrices d'antigène et l'expression par les cellules T activées. Contrairement à l'action de 4-1BBL par les cellules présentatrices d'antigène, l'expression de

4-1BBL par les cellules T leucémiques mène à l'inhibition de la prolifération et favorise l'apoptose (*Michel, J., et al, 1999*) indiquant ainsi que 4-1BBL exerce son action dépendamment du type cellulaire. Par ailleurs, un haut niveau de 4-1BBL soluble a été détecté dans le sérum de patients atteints de lymphome non-Hodgkin's et la leucémie myéloïde aiguë (*Palma, C., et al, 2003*).

Certaines données publiées dans la littérature montrent qu'à part de 4-1BB, TRAF1 est surexprimé aussi dans plusieurs tumeurs d'origine de cellules B (leucémie et lymphomes). Il semble que TRAF1 est un médiateur critique, impliqué dans plusieurs cascades de signalisation oncogéniques ainsi que dans la survie de lymphocytes malignes (*Zapata, J.M., et al, 2000; Lee, S., et al, 2007*). TRAF1 a été montré surexprimé dans une variété de lymphome de nature cellules B, incluant non Hodgkin lymphoma (NHL) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (*Munzert, G., et al, 2002*). Selon une étude, (*Zapata, J.M., et al, 2000*), une analyse faite sur 83 lignées cellulaires tumorales humaines a révélée l'expression de TRAFs particulières dans certains types de cancer. Par exemple, l'expression de TRAF1 a été limitée aux leucémie et lymphomes de nature cellules B exprimant constamment ce membre de la famille TRAFs. Une analyse immuno-histochimique de 232 échantillons en provenance des patients atteints de lymphome non-Hodgkin démontre que TRAF1 est surexprimé dans 48% de cas analysés. De plus, un niveau de l'expression très élevée de cette protéine a été observé dans les cellules B circulantes en provenance des patients atteints de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) comparé au PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) des donneurs sains. Il est intéressant de noter que, les patients ayant la LLC dont les cellules expriment les plus hauts niveaux de TRAF1 sont résistants au traitement, ce qui suggère que les niveaux élevés de TRAF1 donneraient un avantage de survie plus accrue aux cellules. D'ailleurs, la surexpression de TRAF1 dans les cellules B tumorales est perçue être à la base de la survie des cellules cancéreuses (*Zapata, J.M., et al, 2000*). Il est à noter que dans un rapport analysant les variations génétiques communes dans des gènes cibles qui sont associés avec l'immunité et l'inflammation ainsi qu'à la prédisposition au développement du lymphome non-Hodgkin (NHL) en étudiant les SNP (single nucléotide polymorphisme), il a été déterminé que TRAF1 est fortement associé avec un risque de développer cette maladie (*Cerhan, J.R., et al, 2007*). En effet, toutes les études citées nous font croire que les gènes du récepteur 4-1BB et de TRAF1 pourrait être impliqués dans la survie accrue des lymphocytes malignes, promouvant ainsi la formation des cellules

tumorales s'échappant de la surveillance du système immunitaire, menant ainsi à la croissance et la prolifération incontrôlées et en conséquence à des maladies incurables comme la Leucémie Lymphoïde Chronique (CLL) caractérisée par une survie accrue et une accumulation des lymphocytes B matures mais non fonctionnels dû à un défaut de l'apoptose.

CHAPITRE 2. PROJET DU RECHERCHE

2.1. Problématique et hypothèses

L'équilibre entre les signaux de survie et de mort des lymphocytes joue un rôle critique dans l'issue de la réponse immunitaire. Plusieurs études ont été consacrées afin de bien comprendre les mécanismes qui contrôlent la survie de cellules malignes provoquant ainsi des dommages importants dans notre organisme et menant à un cancer et à la mort. Les efforts de plusieurs groupes de recherche ont permis une meilleure compréhension de la réponse immunitaire innée et adaptative au cours de développement d'un cancer et les molécules impliquées dans différentes cascades, qui normalement doivent être bien contrôlées. Plusieurs thérapies ont été développées et employées afin d'aider les patients souffrants du cancer. Malheureusement, malgré l'effort de plusieurs groupes de recherche dans le domaine du cancer, nos connaissances sur les mécanismes précis contrôlant la survie des lymphocytes malins est toujours un domaine obscur car les cellules cancéreuses s'échappent à la surveillance de notre système immunitaire. De plus, dans plusieurs cas, les patients démontrent une résistance aux traitements. En fait, les cellules cancéreuses ont développé une variété de stratégies afin de cibler certaines molécules impliquées dans les cascades de signalisations favorisant la survie cellulaires en s'échappant à la réponse immunitaire de l'hôte en promouvant leur propre propagation ou la persistance en les activant constitutivement. Alors, il est très important de bien comprendre, dans le cas d'une maladie comme le cancer, quels sont les mécanismes qui gouvernent dans le défaut de cette réponse immunitaire et quelles molécules sont impliquées afin de pouvoir établir différentes stratégies basées sur l'immunothérapie car chaque molécule impliquée dans la survie des lymphocytes malins est une cible thérapeutique méritante les études plus approfondies.

Il est peu connu sur les voies de signalisation TRAF1-dépendantes après l'engagement du récepteur 4-1BB dans les lymphocytes. Les études précédentes ont démontré des parties distinctes de la cascade TRAF1-dépendante après l'engagement du récepteur 4-1BB menant à

la survie des lymphocytes T (*Sabbagh, L., et al, 2006; Sabbagh, L., et al, 2008*). Par contre, aucune étude n'a démontré le mécanisme précis par lequel 4-1BB soutient la survie des cellules T CD8⁺ après le recrutement de TRAF1. En effet, le mécanisme par lequel TRAF1 lie ERK est peu clair, menant ainsi à la réduction des niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim après l'engagement du 4-1BB dans les lymphocytes T. Les études plus approfondies sont nécessaires afin de bien comprendre si TRAF1 agit seul dans l'activation d'ERK ou s'il y a d'autres partenaires de TRAF1 qui pourraient lier TRAF1 à la voie de la MAP kinase ERK en aval de 4-1BB.

Plusieurs études indépendantes démontrent, que les molécules impliquées dans la cascade de signalisation en aval du récepteur 4-1BB menant à la survie des lymphocytes T sont surexprimées dans les différents types de cancers. La surexpression du récepteur 4-1BB (*Palma, C., et al, 2003 ; Kim, K-M. et al, 2002*) ainsi que de TRAF1 (*Zapata, J.M., et al, 2000 ; Lee, S., et al, 2007*) donnerait un avantage de survie plus accrue aux cellules qui peut être à la base de la survie des cellules cancéreuses.

Le but de ce mémoire a été de mieux comprendre les mécanismes de signalisation en aval de 4-1BB et leur implication dans la survie des cellules lymphoïdes (lymphocytes T et lymphocytes B) saines et malignes.

2.2. Objectifs

1) D'identifier le ou les partenaires de TRAF1 impliqués dans l'activation de la MAP kinase ERK menant à la modulation des niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim promouvant la survie de lymphocytes T en aval de récepteur 4-1BB.

2) D'étudier la cascade après l'engagement du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines et humaines et évaluer l'implication du récepteur 4-1BB, de TRAF1 et des partenaires de signalisation impliqués dans la survie des lymphocytes B.

CHAPITRE 3. ARTICLES SCIENTIFIQUES

3.1. Articles scientifique 1

Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells

Sabbagh L, Andreeva D, Laramée GD, Oussa NA, Lew D, Bisson N, Soumounou Y, Pawson T, Watts TH.

3.1.1. Résumé de l'article 1.

4-1BB est un membre de la superfamille TNFR impliqué dans l'activation des voies de signalisation menant à la survie des cellules T activées et les cellules T mémoires. Nous avons montré précédemment que TRAF1, une protéine adaptatrice recrutée par le récepteur 4-1BB, est requise pour la survie des cellules T CD8⁺ *in vivo*. En utilisant une approche protéomique dans les cellules T primaires, nous avons identifié LSP1 comme une nouvelle protéine recrutée au complexe de signalisation 4-1BB de manière TRAF1-dépendante. Une caractérisation plus poussée de l'interaction entre TRAF1 et LSP1 a montré que LSP1 lie directement le domaine unique TRAF-N de TRAF1. Similairement aux cellules T déficientes en TRAF1, les cellules T déficientes en LSP1 ne sont pas capables d'activer la MAP kinase ERK après une stimulation anti-4-1BB et, par conséquent, ne sont pas en mesure de moduler l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim. De plus, nous démontrons que l'absence d'expression de LSP1 conduit à l'expansion et une survie défectueuse des cellules T en réponse à une stimulation anti-4-1BB. Ainsi, nous avons identifié LSP1 comme un nouveau médiateur impliqué dans la signalisation 4-1BB et la survie des cellules T. Collectivement, notre travail montre que TRAF1 et LSP1 coopèrent en aval de 4-1BB afin d'activer la cascade de signalisation d'ERK et moduler les niveaux de Bim conduisant à l'amélioration de la survie des cellules T.

3.1.2. Article scientifique

Leukocyte Specific Protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signalling downstream of 4-1BB in T cells

Laurent Sabbagh,^{*,†,1} Daniela Andreeva,^{*,†} Geneviève Dubeau Laramée,^{*,†} N.A. Eustache Oussa,^{*,†} Déborah Lew,^{*} Nicolas Bisson,^{‡,2} Youssouf Soumounou,^{*} Tony Pawson,^{‡,§} and Tania H. Watts[¶]

^{*}Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Montreal, QC, Canada H1T 2M4

[†]Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

[‡]Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada M5G 1X5

[§]Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S 1A8

[¶]Department of Immunology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S 1A8

Summary sentence: TRAF1 and LSP1 are direct binding partners and cooperate to promote survival of primary T cells in response to 4-1BB co-stimulation.

Running Title: LSP1 signals T cell survival downstream of 4-1BB

Key words: co-stimulation, ERK, Bim

Total character count: 27 458

Total number of figures: 6

Total number of references: 46

Total number of words in abstract: 205

Total number of words in summary sentence: 21

ABBREVIATIONS

-/- = deficient

LSP1 = Leukocyte Specific Protein 1

NHL = non-Hodgkin lymphoma

TCR = T cell receptor

TNFRs = Tumour necrosis factor receptors

TRAF = TNFR-associated factor

WT = wildtype

ABSTRACT

4-1BB is a member of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) superfamily which contributes to the activation of signalling pathways required for the survival of activated and memory T cells. We have previously shown that TNFR-associated factor 1 (TRAF1), an adaptor protein recruited to 4-1BB, is required for 4-1BB-mediated CD8 T cell survival *in vivo*. Using a proteomics approach in primary T cells, we have identified Leukocyte Specific Protein 1 (LSP1) as a novel protein recruited to the 4-1BB signalling complex in a TRAF1-dependent manner. Further characterization of the interaction between TRAF1 and LSP1 revealed that LSP1 requires the TRAF-N domain of TRAF1 for direct association. Similarly, to TRAF1-deficient T cells, T cells lacking LSP1 exhibit impaired ERK activation following stimulation through 4-1BB and consequently are unable to downmodulate expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim. Moreover, we demonstrate that the absence of LSP1 expression leads to defective expansion and survival of T cells in response to 4-1BB stimulation. Thus, we have identified LSP1 as a new mediator involved in 4-1BB signalling and T cell survival. Collectively, our work shows that TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB to activate ERK signalling and downmodulate the levels of Bim leading to enhanced T cell survival.

INTRODUCTION

Tumour necrosis factor receptors (TNFRs) are a family of cell surface receptors which transmit survival and death signals in lymphocytes, and as a consequence, play a critical role in the fate of effector T cells and the maintenance of memory T cells [1-3]. TNFR-associated factors (TRAFs) are a family of adaptor proteins involved in linking TNFR family members to downstream signalling pathways [4]. 4-1BB is a member of the TNFR family that recruits TRAF1 and TRAF2 to its cytoplasmic tail and in the absence of its ligand (4-1BBL), a 2-3-fold defect was observed in the maintenance of CD8 memory T cells [5]. Furthermore, the defect in CD8 memory T cell recovery from TRAF1^{-/-} mice was 5-7-fold lower compared to wild-type controls[2], suggesting that TRAF1 plays a central role downstream of additional TNFRs in the maintenance of CD8 memory T cells.

TRAF proteins have in common a conserved TRAF domain at the C-terminus, consisting of TRAF-N and TRAF-C domains. While TRAF-N domains mediate homotypic and heterotypic oligomerization, TRAF-C domains associate with the cytoplasmic tails of TNFRs. The N-terminus region of most TRAF proteins (TRAF2-7) contain a series of Zn fingers and a RING finger responsible for signalling through the stress activated protein kinase and NF- κ B signalling pathways, respectively [6, 7]. TRAF1 is unique in that it lacks the RING finger domain present in all other TRAFs and has the most restricted expression pattern, found almost exclusively in lymphocytes, dendritic cells and certain epithelia [4, 8, 9]. Interestingly, overexpression of an N-terminus deletion mutant of TRAF1 interfered with TNF-induced activation of NF- κ B and JNK [10], highlighting the importance of the less conserved N-terminus region of TRAF1 in signal downstream of TNFRs.

We have previously shown a requirement for TRAF1 in the survival and maintenance of CD8 memory T cells in the absence of antigen *in vivo* [2]. Antigen-specific T cells deficient for TRAF1 showed decreased recovery compared to wildtype (WT) T cells, when cells were allowed to compete for survival signals *in vivo*. Further analysis revealed that TRAF1 was required in CD8 T cells to downmodulate the levels of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim, thereby promoting cell survival.

4-1BB is a TRAF1-binding receptor which has been shown to be important for CD8 T cell survival [5, 11, 12]. Additionally, stimulation through 4-1BB of pre-activated T cells was shown to inhibit activation induced cell death [13]. In investigating the cooperation between 4-1BB and TRAF1 we demonstrated that TRAF1 is required for the activation of ERK and Bim downmodulation downstream of 4-1BB. This signalling axis has proven to be required for the survival and maintenance of activated antigen-specific CD8 T cells [14]. However, how TRAF1 links 4-1BB to survival signalling pathways remains to be determined.

In this report we use immunoprecipitation and mass spectrometry on signalling complexes isolated from primary antigen specific CD8 T cells to identify novel TRAF1-binding partners that could link TRAF1 to the ERK pathway downstream of 4-1BB. Initially, we demonstrate that Leukocyte Specific Protein 1 (LSP1) is recruited to the 4-1BB receptor in a TRAF1-dependent manner. Furthermore, we confirm the direct association of TRAF1 with LSP1 and demonstrate that the interaction requires the TRAF-N domain of TRAF1. Interestingly, LSP1 has been shown to associate with MEK1 and activate ERK2 following the stimulation of B cells with anti-IgM [15]. Indeed, similar to TRAF1^{-/-} T cells, ERK activation, Bim downmodulation and survival are defective in 4-1BB stimulated LSP1^{-/-} T cells. This study characterizes the novel

interaction between TRAF1 and LSP1, and identifies LSP1 as a crucial new player in TRAF1-dependent 4-1BB signalling which is required for survival of primary T cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice. C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, QC, Canada). OT-I mice [16] were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). *TRAF1*^{-/-} gene-targeted mice [17] backcrossed onto C57BL/6 background (n=8), as well as OT-I *TRAF1*^{-/-} mice [2] have been described. *LSP1*^{-/-} gene-targeted mice have been described [18] and were kindly provided by Dr. Jenny Jongstra-Bilen (University Health Network, Toronto, ON). OT-I transgene expression was assayed using anti-V α 2 and anti-V β 5.1 (eBiosciences, San Diego, CA, USA). Mice were maintained under SPF conditions in sterile microisolator caging. All studies involving mice were performed in accordance with the regulations of the Canadian Council on animal care.

Lymphocyte isolation, stimulation and survival assay. Total splenocytes from OT-I WT and *TRAF1*^{-/-} mice were incubated with 0.1 μ g/ml of SIINFEKL peptide for 18 hours, excess peptide was washed away and cells were rested for 24 hours. At day 3 post activation, live CD8 T cells were isolated using Lympholyte-M density separation medium (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Purified CD8 OT-I cells were then stimulated with 10 μ g/ml of an agonistic anti-4-1BB antibody (clone 3H3) or control rat IgG antibody (Sigma, Oakville, ON, Canada). T cells from C57BL/6 WT, *TRAF1*^{-/-} and *LSP1*^{-/-} mouse spleens and lymph nodes were isolated by negative depletion using magnetic bead separation (Easy Sep, StemCell, Vancouver, BC, Canada), purity was >90%. T cells (10⁶ cells/ml) were stimulated with plate bound anti-CD3 ϵ (1 μ g/ml, clone 145-2C11) and anti-CD28 (10 μ g/ml, clone 37.51). Activated cells were then

stimulated with 10µg/ml of an agonistic anti-4-1BB antibody (clone 3H3) or control rat IgG antibody. The number of live cells in the cultures was determined by Trypan blue exclusion.

Flow cytometry. Cells were surface-stained with anti-CD8α-PerCP (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), anti-CD4-PE, biotinylated anti-4-1BB and streptavidin-APC (eBioscience). Samples were acquired and analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) and FlowJo software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA), respectively.

Immunoprecipitation and Western blot analysis. After stimulation with anti-4-1BB or rat IgG control, cells were washed in cold PBS, resuspended in lysis buffer (Tris buffered saline containing 0.4mM EDTA, 1% NP40, and the complete protease inhibitors cocktail (Roche, Mississauga, ON, Canada)). Protein G-sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) coupled to anti-4-1BB (clone 3H3) or anti-TRAF1 (clone N19; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) antibodies (1 µg of antibody per 30x10⁶ cells) were used to immunoprecipitate the 4-1BB or TRAF1 complex, respectively, overnight at 4°C. Immunoprecipitates were washed 4 times in lysis buffer and then subjected to SDS-PAGE, and then transferred to PVDF membranes (Pall Life Sciences, Mississauga, ON, Canada). Membranes were probed with antibodies specific for TRAF1 (Santa Cruz Biotechnology), LSP1, Bim, total and phospho-ERK1/2 (pT202/pY204) (Cell Signaling Technology, Whitby, ON, Canada), 4-1BB (Alexis Biochemical, Burlington, ON, Canada) or β-actin (Sigma) and incubated with the HRP-conjugated anti-rabbit or anti-rat Ig antibody (Sigma). Signals were revealed with the Amersham ECL detection system (GE Healthcare Life Sciences) and digital images were acquired using the ImageQuant LAS-4000 biomolecular imager (GE Healthcare).

Exposure times for WT, TRAF1^{-/-}, and LSP1^{-/-} blots were identical since images were acquired at the same time. The intensity of the bands of interest was determined using the Multi Gauge software version 2.3 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Quantification was determined by normalizing the signal intensity of p-ERK2 to total ERK2, p-BimEL to BimEL and BimEL to actin to account for possible differences in blotting efficiency.

Mass Spectrometry. Affinity-purified protein complexes were further washed twice in 50 mM Tris pH 7.4 containing protease inhibitors. Proteins were eluted off protein G sepharose beads with 100µL of 50 mM H₃PO₄, pH 1.8 on ice for 10 minutes. The elution was repeated twice; the eluates were pooled, acidity verified (pH 2) and stored at -80°C until tryptic digestion. Samples were processed using a solid-phase digest protocol (also known as ‘proteomic reactor’). Briefly, columns were made with 200 µm (internal diameter) fused-silica tubing blocked at one end with a Kasil 1624 (PQ Corporation, Etobicoke, ON, Canada) frit and pre-washed with methanol. Columns were packed with 3 cm of PolySulphoethyl A beads (particle size 12 µm, pore size 300 Å) (Western Analytical, Chino, CA, USA) using a pressure bomb (nitrogen gas, 100-500 psi) and washed with 10 mM potassium phosphate buffer pH 3. The approximate flow rate used was 5-100 µL/min. Protein samples recovered from elution were loaded on the column and washed with 30 µL of 10 mM potassium phosphate buffer pH 3 and 15 µL of HPLC grade water. Bound proteins were reduced in DTT solution (100mM DTT/10mM NH₄HCO₃, pH 8) for 30 minutes and washed with 2 µL of HPLC grade water. Reduced proteins were simultaneously alkylated and trypsin-digested for 1-2 hours in trypsin solution (2mg/ml sequencing grade porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA)/100mM Tris/10mM iodoacetamide, pH 8).

Peptides were eluted in 15 μL of 200 μM NH_4HCO_3 , pH 8 and the solution was acidified by adding 1 μL of 50% CH_2O_2 , for a final volume of 16 μL for each sample. A QSTAR Elite QqTOF mass spectrometer equipped with a nanospray III ion source (AB Sciex, Concord, ON, Canada), and coupled to an Eksigent 1D+ Nano LC (Dublin, CA, USA) was used. Tandem mass spectra were extracted, charge state deconvoluted and deisotoped in Analyst version 2.0. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK). Mascot was set up to search the subset of all murine proteins extracted from the ENSEMBL database (*Mus musculus*, release 49). Searches were performed with carbamidomethyl (C) set as a fixed modification and deamidated (NQ), pyro-Glu (N-term Q), pyro-Glu (N-term E), phospho Tyr, and phospho Ser/Thr set as variable modifications. Trypsin was selected for enzyme digestion with up to 2 missed cleavages. QqTOF type fragmentation was selected with peptide mass tolerance set to 80 ppm, and fragment mass tolerance set to 0.15 Da. Scaffold (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were generally accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm. Protein identifications were generally accepted if they could be established at greater than 95.0% probability and contained at least 1 identified peptide. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm.

GST-fusion protein purification and pull down assay. GST-TRAF1 (FL, ΔC and ΔNC) was cloned into the pGEX-5X-1 plasmid, transformed into BL21 λDE3 *E. coli*, and protein expression was induced with 1mM IPTG (Sigma) for 2 hours. LSP1 cloned into the pGEX-4T-1 vector was kindly provided by Dr. Jan Jongstra (University Health Network, Toronto, ON).

Cultures were harvested, resuspended in PBS and 1% triton and sonicated on ice in short pulses for 10 min. Supernatants were then clarified and GST-fusion proteins were isolated with Glutathione Sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences). The GST moiety was cleaved from LSP1 by incubating the purified protein with 8 μg of thrombin for 30 min. at 37°C. Thrombin protease cleavage site is not present in the pGEX-5X-1 plasmid that contained the TRAF1 cDNA. The purity of the proteins was verified by Coomassie blue staining (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Equimolar amounts of GST-TRAF1 (10 μM) or GST bound to Glutathione Sepharose beads were incubated for 2 hours with 10 μg total lysates of HEK293T cells transfected with recombinant LSP1. Protein complexes were washed with 1X PBS, isolated by centrifugation, resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot analysis.

Statistical analysis. Where indicated, p values were obtained using the Student's T-test (unpaired, two-tailed, 95% confidence interval).

RESULTS

Association of LSP1 with the 4-1BB signaling complex. 4-1BB expression is induced upon activation through the T cell receptor (TCR) and co-stimulation [19] or in the presence of cytokines[5, 20]. To identify TRAF1 binding partners which link the ERK pathway downstream of the 4-1BB receptor, a TCR transgenic model (OT-I) was used where the CD8 T cells have specificity to an ovalbumin (OVA) epitope (SIINFEKL) presented by the H-2K^b major histocompatibility complex class I molecule. OT-I wild-type (WT) or TRAF1^{-/-} splenocytes were activated with the OVA peptide for 18 hours, and the cells were cultured for 48 hours. At the end of the activation, CD8 T cells from OT-I WT or TRAF1^{-/-} cultures were found to express 4-1BB uniformly on the cell surface (Fig. 1A). Activated OT-I T cells were then stimulated with an agonistic anti-4-1BB antibody or a rat IgG control antibody for 15 or 60 min and the 4-1BB receptor complex was then immunoprecipitated. A fraction of the immunoprecipitation was used to confirm the presence of 4-1BB and TRAF1 by Western blotting (Fig. 1B). The other fraction of the immunoprecipitates were subjected to gel-free liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using solid phase tryptic digestion. This approach allowed us to identify LSP1 as a potential molecule that is recruited to the 4-1BB receptor complex in a TRAF1-dependent manner since we only observed unique peptides corresponding to LSP1 from immunoprecipitates isolated from OT-I WT cells (Fig. 1C and Table S1). Furthermore, the levels of LSP1 in OT-I WT and TRAF1^{-/-} cells were similar following T cell activation with the OVA peptide demonstrating that the absence of TRAF1 does not affect endogenous LSP1 levels (Fig. 1D). Although the levels of LSP1 increased when the cells were kept in culture for an additional day in both OT-I WT and TRAF1^{-/-} cells, overnight stimulation

with anti-4-1BB had no effect on the levels of LSP1 when compared to rat IgG control. Interestingly, others have shown that LSP1 targets the ERK scaffold protein KSR and the ERK/MAP kinase pathway components MEK1 and ERK2 to peripheral actin filaments in B cells stimulated with anti-IgM [15]. This suggests that LSP1 might link TRAF1 to the ERK signalling pathway downstream of 4-1BB.

TRAF1 co-immunoprecipitates with LSP1. To determine whether LSP1 and TRAF1 are within the same protein complex, we then directly immunoprecipitated TRAF1 from OVA peptide activated OT-I WT or TRAF1^{-/-} cells (as a specificity control), following 4-1BB stimulation for 15 and 60 min, and LC-MS/MS was then performed, as described above (Fig. 2A). Indeed, LSP1 was found to co-immunoprecipitate with TRAF1 based on the unique peptides identified by MS/MS (Fig. 2B and Table S2). TRAF2, which is known to associate with TRAF1 through the TRAF domains, was also identified along with cIAP1 and cIAP2, two proteins that have been previously shown to associate with TRAF1 thereby validating our experimental approach [21, 22]. Additionally, Western blot analysis on immunoprecipitated TRAF1 from 4-1BB activated OT-I WT cells revealed that TRAF1 and LSP1 do co-immunoprecipitate (Fig. 2C). Interestingly, when TRAF1 was immunoprecipitated from OT-I WT cells, higher levels of LSP1 were observed to be associated with TRAF1 when stimulated with the anti-4-1BB agonistic antibody in contrast to control rat IgG (Fig. 2C). Although there is co-association of low levels of LSP1 with TRAF1 in the absence of 4-1BB stimulation, crosslinking of the 4-1BB receptor appears to enhance or stabilizes the recruitment of the interacting components.

LSP1 is a TRAF1 binding protein. The findings from the LC-MS/MS and TRAF1 co-immunoprecipitation experiments demonstrated that TRAF1 and LSP1 are found within the same complex in CD8 T cells. To determine whether the interaction between TRAF1 and LSP1 is direct both proteins were fused to GST and purified from *E. coli* cultures induced with IPTG. The cDNAs for both proteins were cloned in GST expression vectors with different protease cleavage recognition sites (see methods) allowing the removal of the GST moiety from the GST-LSP1 fusion protein with thrombin without compromising the GST-TRAF1 fusion protein (Fig. 3A). GST-TRAF1 or GST purified protein was then incubated with equal amounts of recombinant LSP1 for 2 hrs and protein complexes were then isolated with Glutathione-Sepharose beads. Western blotting for LSP1 revealed that LSP1 interacts with GST-TRAF1 significantly compared to GST alone (Fig. 3B). The non-specific binding of LSP1 to the GST protein alone may be due to improper protein folding or absence of post-translational modification of LSP1 when produced in *E. coli*. Therefore, when mapping the interaction between TRAF1 and LSP1, recombinant LSP1 was overexpressed in HEK-293T cells and total lysates were used in subsequent GST-pull down assays.

To determine whether the binding of LSP1 to TRAF1 is dependent on the conserved C-terminal region of TRAF1 consisting of the TRAF-N and -C domains, the TRAF1 lacking the TRAF-C domain (Δ C) or both the TRAF-N and -C (Δ NC) were fused to GST (Fig. 3C) and purified from *E. coli* cultures (Fig. 3D). Recombinant LSP1 was then overexpressed in HEK-293T cells and equal amounts of total lysates were then incubated with the different GST-TRAF1 constructs or GST alone. Protein complexes were isolated with Glutathione-Sepharose beads and resolved on SDS-PAGE. Western blotting for LSP1 revealed that LSP1 interacts with GST-TRAF1 in contrast to GST alone confirming the association of LSP1 with TRAF1 (Fig. 3E). The GST-

pulldown assay also showed that LSP1 requires the TRAF-N domain for its association with TRAF1 since LSP1 was capable of binding the TRAF1 Δ C deletion but not the TRAF1 Δ NC deletion (Fig. 3E). These findings demonstrate that LSP1 binds directly to TRAF1 through its TRAF-N domain.

Defective ERK activation in the absence of TRAF1 and LSP1 downstream of 4-1BB signalling. LSP1 has been shown to target MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton [15]. In addition, LSP1-associated MEK1 was shown to be activated following anti-IgM stimulation of B cells which subsequently activates ERK2 leading to its dissociation from LSP1. We have previously shown, that TRAF1 was required downstream of the 4-1BB receptor to mediate ERK activation in CD8 T cells [14]. Given our current findings that LSP1 is associated with the 4-1BB signalling complex in a TRAF1-dependent manner, we predicted that LSP1 links TRAF1 to ERK activation downstream of 4-1BB. To test this hypothesis, we investigated the requirement of LSP1 for ERK activation downstream of 4-1BB signalling. T cells ($CD4^+$ and $CD8^+$) were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice (all on C57BL/6 background) and stimulated for 2 days with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 antibodies to induce maximal surface expression of 4-1BB. The absence of TRAF1 or LSP1 had no impact on 4-1BB surface expression which was expressed at similar levels on both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (Fig. 4A). Activated T cells were then stimulated with an agonistic anti-4-1BB antibody or a rat IgG control and ERK activation was determined by Western blot analysis at different time points. As we have previously shown, in the absence of TRAF1, activation of ERK is compromised following 4-1BB stimulation compared to WT cells (Fig. 4B) [14]. Strikingly, a comparable defect in sustained ERK activation downstream of 4-1BB is observed in LSP1-deficient T cells

(Fig. 4B). This finding is in agreement with the role of LSP1 in linking and activating components of the ERK pathway following the crosslinking of diverse surface receptors [15].

LSP1 is required downstream of 4-1BB to modulate Bim levels. ERK has been shown to be activated following 4-1BB stimulation [23] and our previous work has demonstrated that 4-1BB requires TRAF1 to mediate ERK activation [14]. In addition, inhibition of ERK results in increased Bim levels in primary WT T cells similar to the levels observed in TRAF1^{-/-} T cells cultured in the absence of the ERK inhibitor, suggesting that ERK is required for TRAF1-dependent Bim downregulation downstream of 4-1BB [14]. The levels of Bim have been previously shown to be regulated by the activation of the ERK pathway leading to Bim phosphorylation and degradation [24, 25]. Given that we observed defective ERK activation downstream of 4-1BB in the absence of LSP1 (Fig. 4B) we next sought to determine if Bim levels are affected in LSP1^{-/-} T cells similarly to TRAF1^{-/-} T cells [2, 14]. When WT T cells were activated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 and subsequently stimulated with plate bound anti-4-1BB, only WT T cells were capable of inducing Bim phosphorylation following 4-1BB stimulation when compared to IgG control (Fig. 5A,B). As a consequence of Bim phosphorylation, only WT T cells demonstrated reduced Bim_{EL} protein levels in contrast to rat IgG control, unlike TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} T cells which were incapable of reducing the levels of Bim_{EL} following anti-4-1BB stimulation (Fig. 5C). These results demonstrate that Bim levels are downregulated in the presence of TRAF1 and LSP1 following 4-1BB stimulation of T cells.

4-1BB-dependent responses require LSP1. Finally, we sought to further investigate the contribution of LSP1 to 4-1BB-dependent expansion and survival signals. In the absence of CD28 co-stimulation during priming, stimulation with an agonistic anti-4-1BB was shown to restore secondary responses in CD8 T cells [26]. In addition, we have previously shown that TRAF1 enhances cell division and survival in a 4-1BB-dependent manner [14]. Therefore, to evaluate the requirement for LSP1 during 4-1BB-dependent co-stimulatory responses, WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} T cells were activated with anti-CD3 ϵ only. By 48 hours after activation WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} T cells showed similar levels of 4-1BB on their surface (Fig. 6A). T cells from each genotype (10^5 cells) were subsequently stimulated with plate-bound agonistic anti-4-1BB antibody or rat IgG control for 12 or 24 hours. T cells isolated from WT mice showed the highest (~3-fold) expansion 12 hours after stimulation with anti-4-1BB, whereas WT T cells stimulated with rat IgG control showed a ~2.4-fold expansion ($p=0.019$) (Fig. 6B). The response to 4-1BB stimulation in WT T cells was more significant at 24 hours post co-stimulation when compared to rat IgG control ($p=0.0043$). In contrast, we did not observe any significant enhancement in the recovery of live TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} T cells in response to anti-4-1BB when compared to rat IgG control (Fig. 6B). Although 4-1BB had a small effect on cell recovery of TRAF1^{-/-} T cells, likely through TRAF2, the effects of 4-1BB on survival when cells lacked TRAF1 didn't reach statistical significance. Importantly, LSP1 deficient cells showed no increase in survival in response to 4-1BB signalling. Collectively, these findings demonstrate that cooperation between TRAF1 and LSP1 is required downstream of 4-1BB to activate the ERK pathway, downmodulate the levels of Bim and enhance T cell survival.

DISCUSSION

In this study, we report that LSP1 associates with the 4-1BB signalling complex in a TRAF1-dependent manner in primary T cells. The direct interaction between LSP1 and TRAF1 represents a first report on the association and cooperation of these molecules in mediating signalling downstream of 4-1BB. We have previously demonstrated that T cells lacking TRAF1 fail to activate ERK following 4-1BB stimulation [14]. In this study we show that the absence of LSP1 in T cells results in a similar defect in ERK activation upon 4-1BB crosslinking. Additionally, the presence of TRAF1 leads to reduced levels of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim and enhanced cell survival of 4-1BB activated T cells, in an ERK-dependent manner [14]. However, LSP1^{-/-} T cells stimulated with a 4-1BB agonistic antibody showed defective activation of the ERK pathway, defective downmodulation of Bim levels and reduced cell survival, similarly to TRAF1^{-/-} T cells. Given that LSP1 has been shown to activate the ERK pathway, the findings presented here demonstrate that TRAF1 recruits LSP1 to 4-1BB in activated T cells leading to ERK-dependent Bim regulation and survival.

TRAF1 has been shown to play a central role downstream of CD40 [27], CD30 [28], TNFR2 [21] and 4-1BB [14, 29] and several of these studies have also linked the presence of TRAF1 to NF-κB activation. It is well documented that TRAF2 regulates NF-κB activation and survival downstream of TNFRs [28, 30, 31]. When we previously investigated the role of TRAF1 downstream of the 4-1BB receptor we observed that the absence of TRAF1 in CD8 T cells lead to a reduction in TRAF2 compared to WT CD8 T cells in total lysates [14]. Similar observations have been reported by others regarding TRAF1-dependent stabilization of TRAF2 levels downstream of other TNFRs [27, 32, 33] suggesting that the contribution of TRAF1 to NF-κB

activation might be mediated indirectly via TRAF2. Recently, Zheng *et al.*, showed that a TRAF1: (TRAF2)₂ heterotrimer interacts more strongly with cIAP2 than with TRAF2 alone. These interactions were dependent on specific residues within the TRAF coiled-coil domains (TRAF-N) and the cIAP2 BIR domains which are required for TNF α -induced NF- κ B activation. Similarly, we found that TRAF1 lacking the coiled-coil domain (TRAF-N), failed to interact with LSP1 even in the absence of other TRAF members (Fig. 3). Furthermore, in the absence of TRAF1 we could not detect LSP1 associated with 4-1BB when the receptor was immunoprecipitated (data not shown). Collectively, these findings demonstrate the importance of TRAF1 as a scaffold protein required for NF- κ B activation through other TRAFs [22] and our findings demonstrating that TRAF1 is required for direct LSP1 binding and ERK activation downstream of 4-1BB.

LSP1 is a cytoskeletal protein that has been shown to accumulate on peripheral actin filaments underneath the plasma membrane [34]. In addition, expression of LSP1 allows the co-localisation of the ERK scaffold protein KSR, MEK1 and ERK2 to peripheral actin filaments. In B cells, crosslinking of surface IgM leads to the activation of LSP1-associated MEK1, followed by the activation of ERK2 which then dissociates from LSP1 to phosphorylate ERK substrates [15]. Interestingly, expression of a truncated form of LSP1 in a B-cell lymphoma cell line, which lacks the ability to activate the ERK/MAP kinase pathway, showed ~85% apoptosis following anti-IgM treatment in contrast to the cell line expressing the full length protein (~30% apoptosis). The findings presented in this report, demonstrate that in the absence of LSP1 in T cells, TRAF1-dependent ERK activation downstream of 4-1BB is compromised, as well as Bim phosphorylation and T cell survival. The regulation of Bim levels has been shown to be dependent on the activation of the ERK pathway [24, 25]. Altogether, these observations

demonstrate that ERK in the LSP1 signalling complex may target Bim for phosphorylation, enhancing cell survival.

The survival of lymphocytes is regulated by the balance between pro- and anti-apoptotic factors of the Bcl-2 family [35]. A recent report has shown that activation of T cells leads to an increase in Bim levels which may be tolerated in effector and memory T cells without inducing cell death if they express high enough levels of Bcl-2 [36]. Our previous [2, 14] and current findings demonstrate that indeed stimulation of T cells leads to an increase in Bim levels even in the presence of TRAF1. However, crosslinking of 4-1BB on the surface of activated WT T cells downmodulates the levels of Bim and enhances cell survival. In contrast, TRAF1 and LSP1 defective T cells lose the capacity to induce sustained ERK activation and modulate Bim levels, resulting in increased cell death.

In addition to linking the ERK pathway, LSP1 has been shown to play a regulatory role in neutrophil chemotaxis during inflammation [18, 37]. When melanoma cells were transfected to overexpress LSP1 at levels 50% of that expressed in neutrophils, a defect in mobility of the cells was observed [38]. These observations suggest that the presence and the levels of LSP1 in a cell will have an impact on the ability of the cell to move and interact with neighbouring cells. When TRAF1 was immunoprecipitated from OT-I WT cells, higher levels of LSP1 were observed to be associated with TRAF1 when cells were stimulated with the anti-4-1BB agonistic antibody in contrast to control rat IgG (Fig. 2C). Accordingly, when we looked at the expression levels of LSP1 in activated OT-I cells, we did observe increased protein expression in total lysates at day 4 of culture relative to the previous day. However, 4-1BB stimulation did not have an impact on LSP1 expression when compared to rat IgG control (Fig. 1D). Given the role of LSP1 in affecting cell motility, we hypothesize that increased localized levels of LSP1 could allow 4-

1BB expressing CD8 T cells to sustain prolonged interactions with neighbouring 4-1BB ligand expressing cells and sustain survival signalling through Bim downmodulation in a TRAF1-dependent manner. We have previously shown that TRAF1 is critical for the maintenance of CD8 memory T cells *in vivo* [2]. The demonstration that TRAF1 cooperates with LSP1 downstream of 4-1BB to mediate T cell survival raises the question of whether LSP1 is essential in the long term survival and maintenance of CD8 memory T cells. Since LSP1 has been shown to play a role in other immune cells and other cell types, the use of TCR transgenic mice (OT-I) lacking LSP1 will allow us to study the specific impact of LSP1 in CD8 T cells during an immune response. Furthermore, several reports have shown defective lymphocyte and monocyte recruitment, in an asthma and atherogenesis mouse models lacking TRAF1 [39, 40]. Thus, it would be important to determine whether the absence of LSP1 will demonstrate a similar phenotype as these mouse models and the importance of the contribution of LSP1 to the recruitment of memory T cells to the memory niche [41].

As further evidence of the crucial roles of TRAF1 and LSP1 in cell survival, increased TRAF1 and LSP1 protein expression has been associated with leukemia and lymphomas [9, 42-45]. Interestingly, a report analyzing common genetic variations in candidate genes associated with immunity and inflammation, and the predisposition to the development of non-Hodgkin lymphoma (NHL) using a panel of single nucleotide polymorphisms determined TRAF1 and LSP1 to be strongly associated with the risk and etiology of NHL [46]. This study has identified LSP1 as a novel player downstream of 4-1BB signalling. We have also shown that TRAF1 and LSP1 are direct binding partners and cooperate to activate the ERK pathway leading to the downmodulation of Bim levels and subsequent survival of lymphocytes. Further characterization of this signalling cascade will have important implications in further elucidating

the survival mechanisms induced by TNFR family members in T cells and might reveal the contribution of 4-1BB, TRAF1 and LSP1 to haematological malignancies.

AUTHORSHIP

L.S. performed the immunoprecipitation experiments, Western blot analysis, flow cytometry analysis, analyzed the data and wrote the paper. D.A., G.D.L., N.A.E.O. and D.L. performed the GST-pull down experiments. N.B. processed the immunoprecipitates for LC-MS/MS, performed the analysis and wrote relevant sections. Y.S. generated the constructs for the GST-pull down experiments. T.P. and T.H.W. provided resources and reagents. T.H.W. reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Nathalie Labrecque and Kelly A. Pike for critically reading the manuscript and Nathalie Beaudoin for technical assistance with the mouse colony. This work was supported by the Maisonneuve-Rosemont Hospital Foundation (to L.S.), a grant from the Leukemia and Lymphoma Society of Canada (to L.S.) and by grant #018119 from the Canadian Cancer Society (to T.H.W). L.S. was a Special fellow of the Leukemia and Lymphoma Society (USA), G.D.L. is the recipient of a departmental scholarship from Université de Montréal, N.A.E.O. is the recipient of a doctoral scholarship from the Cole Foundation and T.H.W. holds the Sanofi Pasteur chair in Human Immunology at the University of Toronto.

REFERENCES

1. Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J., Marrack, P. (2007) Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr Opin Immunol* 19, 516-521.
2. Sabbagh, L., Srokowski, C. C., Pulle, G., Snell, L. M., Sedgmen, B. J., Liu, Y., Tsitsikov, E. N., Watts, T. H. (2006) A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18703-18708.
3. Aggarwal, B. B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.
4. Ha, H., Han, D., Choi, Y. (2009) TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11, Unit11 19D.
5. Pulle, G., Vidric, M., Watts, T. H. (2006) IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* 176, 2739-2748.
6. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
7. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D. V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
8. Zapata, J. M. and Reed, J. C. (2002) TRAF1: lord without a RING. *Sci STKE* 2002, PE27.
9. Zapata, J. M., Krajewska, M., Krajewski, S., Kitada, S., Welsh, K., Monks, A., McCloskey, N., Gordon, J., Kipps, T. J., Gascoyne, R. D., Shabaik, A., Reed, J. C. (2000) TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol* 165, 5084-5096.
10. Schwenzler, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R. M., Wajant, H. (1999) The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 274, 19368-19374.
11. Bertram, E. M., Lau, P., Watts, T. H. (2002) Temporal segregation of CD28 versus 4-1BBL-mediated costimulation: 4-1BBL influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the memory response following influenza infection. *Journal of Immunology* 168, 3777-3785.
12. Takahashi, C., Mittler, R. S., Vella, A. T. (1999) Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *Journal of Immunology* 162, 5037-5040.
13. Hurtado, J. C., Kim, Y. J., Kwon, B. S. (1997) Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *Journal of Immunology* 158, 2600-2609.
14. Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E. N., Watts, T. H. (2008) ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol* 180, 8093-8101.
15. Harrison, R. E., Sikorski, B. A., Jongstra, J. (2004) Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 117, 2151-2157.
16. Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., Carbone, F. R. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
17. Tsitsikov, E. N., Laouini, D., Dunn, I. F., Sannikova, T. Y., Davidson, L., Alt, F. W., Geha, R. S. (2001) TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity* 15, 647-657.
18. Jongstra-Bilen, J., Misener, V. L., Wang, C., Ginzberg, H., Auerbach, A., Joyner, A. L., Downey, G. P., Jongstra, J. (2000) LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum. *Blood* 96, 1827-1835.
19. Dawicki, W. and Watts, T. H. (2004) Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 34, 743-751.
20. Lin, G. H., Stone, J. C., Surh, C. D., Watts, T. H. (2011) In vivo accumulation of T cells in response to IL-2/anti-IL-2 mAb complexes is dependent in part on the TNF family ligand 4-1BBL. *Immunol Cell Biol* 90, 743-747.

21. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V. (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.
22. Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., Wu, H. (2010) Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol Cell* 38, 101-113.
23. Choi, J. W., Lee, H. W., Roh, G. S., Kim, H. H., Kwack, K. (2005) CD137 induces adhesion and cytokine production in human monocytic THP-1 cells. *Exp Mol Med* 37, 78-85.
24. Ley, R., Ewings, K. E., Hadfield, K., Cook, S. J. (2005) Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 12, 1008-1014.
25. Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., Korsmeyer, S. J. (2004) Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15313-15317.
26. Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., Watts, T. H. (2004) A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *Journal of Immunology* 172, 981-988.
27. Xie, P., Hostager, B. S., Munroe, M. E., Moore, C. R., Bishop, G. A. (2006) Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol* 176, 5388-5400.
28. Duckett, C. S., Gedrich, R. W., Gilfillan, M. C., Thompson, C. B. (1997) Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol* 17, 1535-1542.
29. Wang, C., Wen, T., Routy, J. P., Bernard, N. F., Sekaly, R. P., Watts, T. H. (2007) 4-1BBL induces TNF receptor-associated factor 1-dependent Bim modulation in human T cells and is a critical component in the costimulation-dependent rescue of functionally impaired HIV-specific CD8 T cells. *J Immunol* 179, 8252-8263.
30. Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L., Karin, M. (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9, 1364-1370.
31. Yeh, W. C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D. V., Mak, T. W. (1997) Early lethality, functional NF-kB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-725.
32. Arron, J. R., Pewzner-Jung, Y., Walsh, M. C., Kobayashi, T., Choi, Y. (2002) Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med* 196, 923-934.
33. Wicovsky, A., Henkler, F., Salzmann, S., Scheurich, P., Kneitz, C., Wajant, H. (2009) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28, 1769-1781.
34. Jongstra-Bilen, J., Janmey, P. A., Hartwig, J. H., Galea, S., Jongstra, J. (1992) The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain. *J Cell Biol* 118, 1443-1453.
35. Opferman, J. T. and Korsmeyer, S. J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410-415.
36. Kurtulus, S., Tripathi, P., Moreno-Fernandez, M. E., Sholl, A., Katz, J. D., Grimes, H. L., Hildeman, D. A. (2011) Bcl-2 allows effector and memory CD8+ T cells to tolerate higher expression of Bim. *J Immunol* 186, 5729-5737.
37. Wang, C., Hayashi, H., Harrison, R., Chiu, B., Chan, J. R., Ostergaard, H. L., Inman, R. D., Jongstra, J., Cybulsky, M. I., Jongstra-Bilen, J. (2002) Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. *J Immunol* 169, 415-423.
38. Howard, T. H., Hartwig, J., Cunningham, C. (1998) Lymphocyte-specific protein 1 expression in eukaryotic cells reproduces the morphologic and motile abnormality of NAD 47/89 neutrophils. *Blood* 91, 4786-4795.
39. Missiou, A., Kostlin, N., Varo, N., Rudolf, P., Aichele, P., Ernst, S., Munkel, C., Walter, C., Stachon, P., Sommer, B., Pfeifer, D., Zirlik, K., MacFarlane, L., Wolf, D., Tsitsikov, E., Bode, C., Libby, P., Zirlik,

- A. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) deficiency attenuates atherosclerosis in mice by impairing monocyte recruitment to the vessel wall. *Circulation* 121, 2033-2044.
40. Oyoshi, M. K., Barthel, R., Tsitsikov, E. N. (2007) TRAF1 regulates recruitment of lymphocytes and, to a lesser extent, neutrophils, myeloid dendritic cells and monocytes to the lung airways following lipopolysaccharide inhalation. *Immunology* 120, 303-314.
 41. Sabbagh, L., Snell, L. M., Watts, T. H. (2007) TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol* 28, 333-339.
 42. Munzert, G., Kirchner, D., Stobbe, H., Bergmann, L., Schmid, R. M., Dohner, H., Heimpel, H. (2002) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 100, 3749-3756.
 43. Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E. N., Ding, H. F. (2007) NF- κ B2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743-751.
 44. Guo, F., Sun, A., Wang, W., He, J., Hou, J., Zhou, P., Chen, Z. (2009) TRAF1 is involved in the classical NF-kappaB activation and CD30-induced alternative activity in Hodgkin's lymphoma cells. *Mol Immunol* 46, 2441-2448.
 45. Marafioti, T., Jabri, L., Pulford, K., Brousset, P., Mason, D. Y., Delsol, G. (2003) Leucocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 120, 671-678.
 46. Cerhan, J. R., Ansell, S. M., Fredericksen, Z. S., Kay, N. E., Liebow, M., Call, T. G., Dogan, A., Cunningham, J. M., Wang, A. H., Liu-Mares, W., Macon, W. R., Jelinek, D., Witzig, T. E., Habermann, T. M., Slager, S. L. (2007) Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 110, 4455-4463.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Identification of LSP1 within the 4-1BB signalling complex. OT-I splenocytes (WT and TRAF1^{-/-}) were stimulated with 0.1µg/ml SIINFEKL peptide for 48 hrs. Live CD8 T cells were isolated from the cultures at day 3 and then incubated with 10µg/ml of anti-4-1BB or control rat IgG. (A) The purity of CD8⁺ T cells and 4-1BB surface expression was confirmed by flow cytometry. (B) Following the stimulation of cells with anti-4-1BB or control rat IgG for the indicated time points, cells were lysed and the 4-1BB receptor complex was immunoprecipitated. 4-1BB and TRAF1 levels were determined in immunoprecipitates by Western blot analysis. (C) The number of unique peptides for LSP1 and 4-1BB identified by LC-MS/MS under different stimulatory conditions from the immunoprecipitated 4-1BB signalling complex is shown. (D) Activated OT-I splenocytes (WT and TRAF1^{-/-}) (D3, Day 3) were stimulated with plate bound anti-4-1BB or control rat IgG for 18 hrs (D4) and the levels of TRAF1, LSP1 and actin were determined in total lysates by Western blot analysis. *Residual signals for TRAF1 and LSP1 can be seen on blots probed for actin.

FIGURE 2. Identification of LSP1 within the TRAF1 signalling complex. OT-I splenocytes (WT and TRAF1^{-/-}) were stimulated with SIINFEKL peptide and activated with anti-4-1BB or control rat IgG as described in figure 1. (A) Following the stimulation of cells with anti-4-1BB or control rat IgG for the indicated time points, cells were lysed and the TRAF1 signalling complex was immunoprecipitated. TRAF1 levels were determined in immunoprecipitates by Western blot analysis. (B) The number of unique peptides for TRAF1, TRAF2, LSP1, cIAP1, and cIAP2 identified by LC-MS/MS under different stimulatory conditions from the

immunoprecipitated TRAF1 signalling complex is shown. (C) The purity of CD8⁺ T cells and 4-1BB surface expression was confirmed by flow cytometry. Following the stimulation of cells with anti-4-1BB or control rat IgG for 15 min, cells were lysed and the TRAF1 signalling complex was immunoprecipitated. TRAF1 and LSP1 levels were determined in immunoprecipitates by Western blot analysis (representative of 3 experiments).

FIGURE 3. TRAF1 and LSP1 are binding partners. (A) Coomassie blue stain of glutathione sepharose purified GST and GST-TRAF1 (pGEX-5X-1) fusion protein is shown. GST-LSP1 (pGEX-4T-1) was purified with Glutathione-Sepharose beads and cleaved with Thrombin to remove the GST moiety. Digestion was then verified on gel. (B) GST-TRAF1 or GST alone (10 μ M) was incubated with recombinant LSP1 (10 μ g) and protein complexes were then isolated with Glutathione-Sepharose beads, resolved on SDS-PAGE and Western blotted for LSP1 (representative of 5 experiments). (C) Schematic representation of GST-coupled full length (FL) TRAF1 and deletion mutants lacking the TRAF-C (Δ C) or TRAF-N and TRAF-C domains (Δ NC). (D) Coomassie blue stain of glutathione sepharose purified GST and GST-TRAF1 FL, TRAF1 Δ C and TRAF1 Δ NC fusion protein is shown. (E) GST-TRAF1 (FL, Δ C and Δ NC) or GST alone was incubated with recombinant LSP1 and protein complexes were then isolated with Glutathione-Sepharose beads, resolved on SDS-PAGE and Western blotted for LSP1. Total lysates from HEK-293T cells transfected with recombinant LSP1 is shown (representative of 3 experiments).

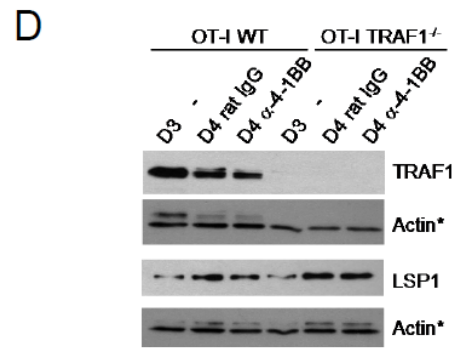
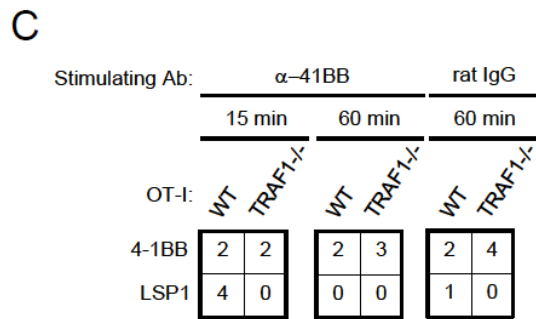
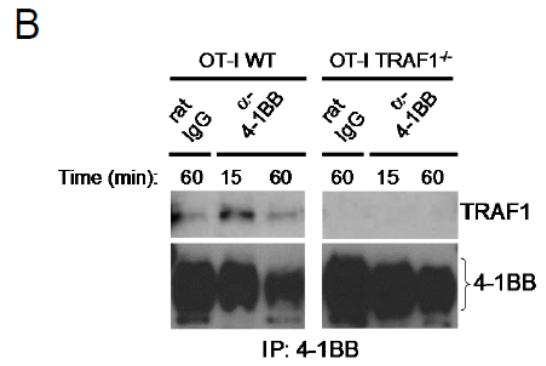
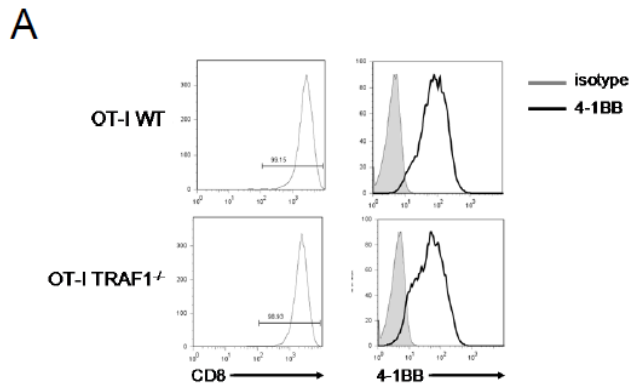
FIGURE 4. The absence of TRAF1 or LSP1 in activated T cells leads to a defect in ERK activation downstream of 4-1BB signalling. T cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice and stimulated with plate bound anti-CD3ε and anti-CD28 for 48 hours. (A) The purity of T cells and 4-1BB surface expression on CD4 and CD8 T cells was determined by flow cytometry. (B) Cells were then stimulated with 10μg/ml anti-4-1BB or control rat IgG for the indicated time points, lysed and the levels of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) and total ERK1/2 were determined by Western blot analysis. The ratios of p-ERK2:ERK2 levels in anti-4-1BB stimulated T cells is shown (representative of 4 experiments).

FIGURE 5. TRAF1 and LSP1 are required for Bim downregulation downstream of 4-1BB. T cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice and stimulated with plate bound anti-CD3ε and anti-CD28 for 48 hours. (A) Activated T cells were stimulated with plate bound anti-4-1BB or control rat IgG for 18 hours and the levels of phosphorylated Bim_{EL} (p-Bim_{EL}) and total Bim_{EL} were determined by Western blot analysis. (B) The ratios of p-Bim_{EL}:Bim_{EL} levels of three independent experiments are shown. (C) The ratios of Bim_{EL}:actin levels of four independent experiments are shown. NS: non significant. Error bars represent the standard error of the mean.

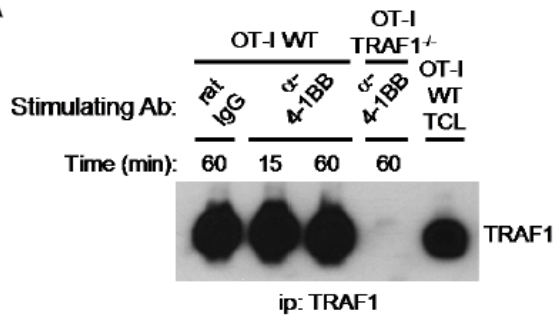
FIGURE 6. TRAF1 and LSP1 are required for efficient expansion in response to 4-1BB. T cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice and stimulated with plate bound anti-CD3ε for 48 hours. (A) Surface expression levels of 4-1BB on WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} T cells was confirmed by flow cytometry. (B) Activated T cells (10⁵) were stimulated with plate bound anti-4-1BB or control rat IgG for 12 or 24 hours. Live cells were enumerated in the cultures

(n=3) based on Trypan blue exclusion (representative of 2 experiments). NS: non-significant.

Error bars represent the standard error of the mean.



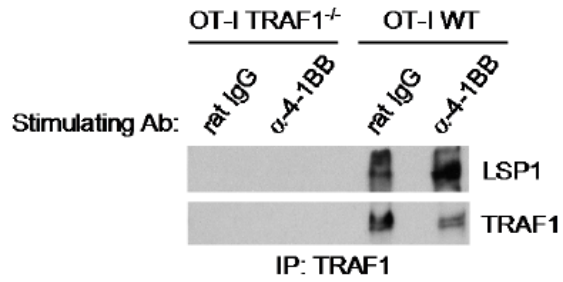
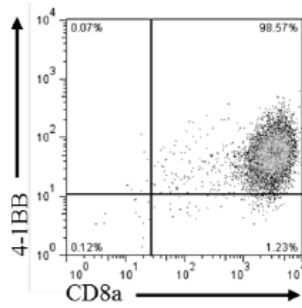
A



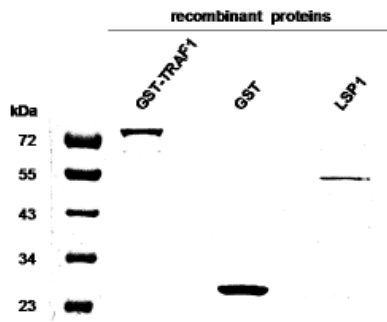
B

Stimulating Ab:	OT-I TRAF1 ^{-/-}		OT-I WT	
	α-4-1BB	rat IgG	rat IgG	α-4-1BB
Time (min):	60	60	15	60
TRAF1	0	19	17	15
TRAF2	0	14	13	5
LSP1	0	0	3	0
cIAP1	0	2	1	0
cIAP2	0	9	5	2

C



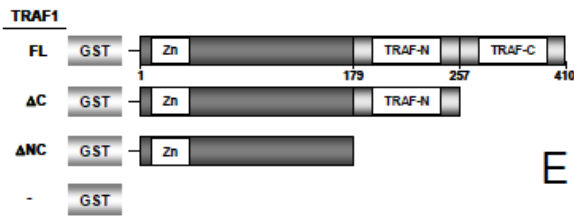
A



B



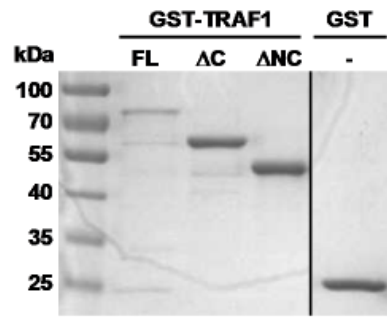
C



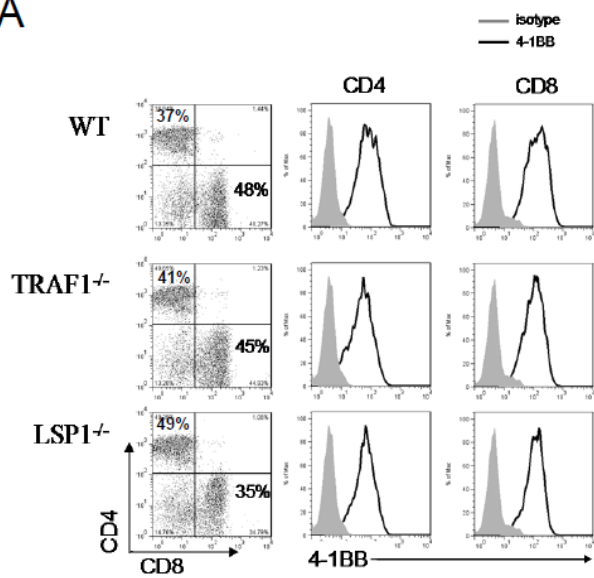
E



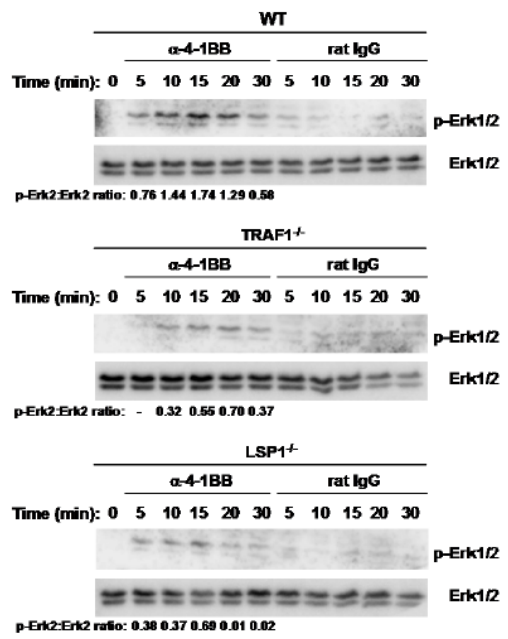
D



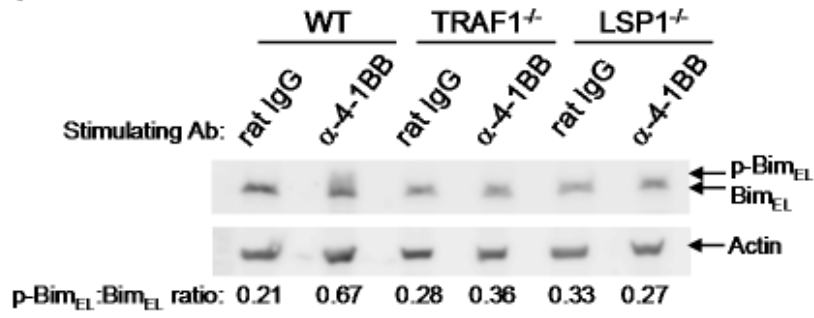
A



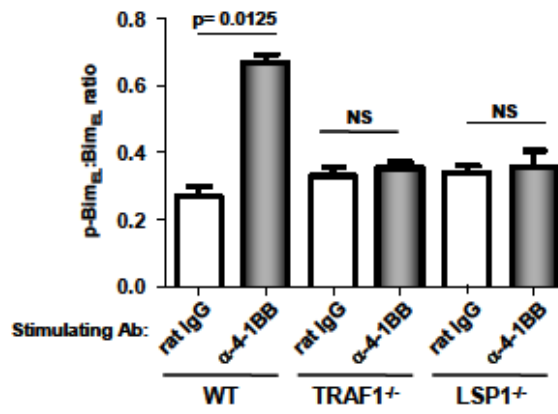
B



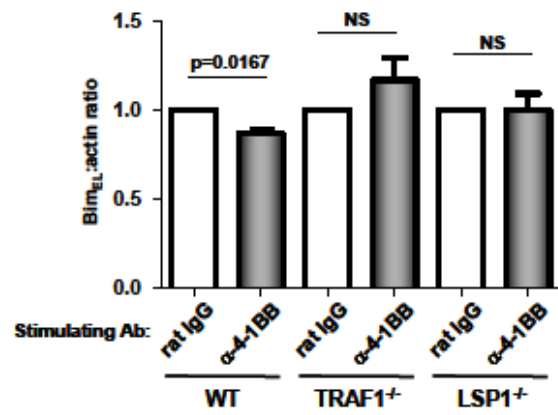
A

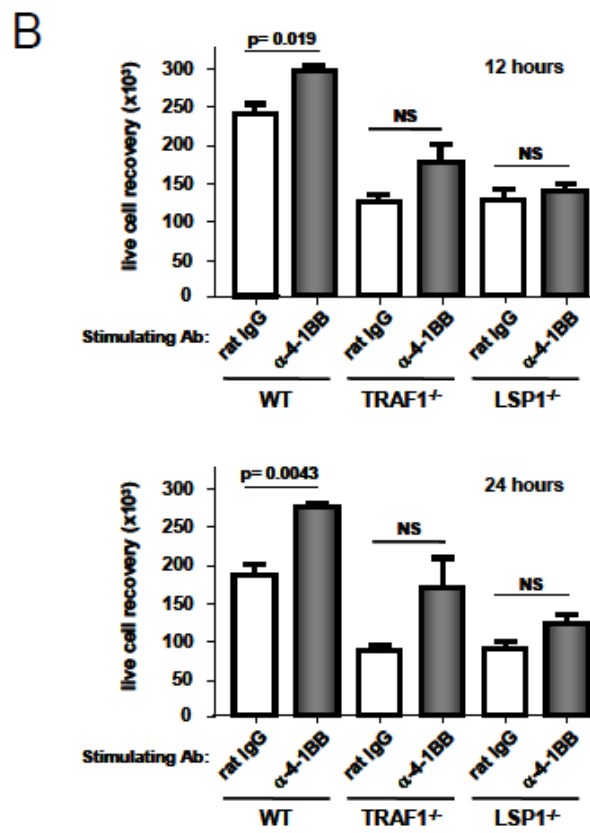
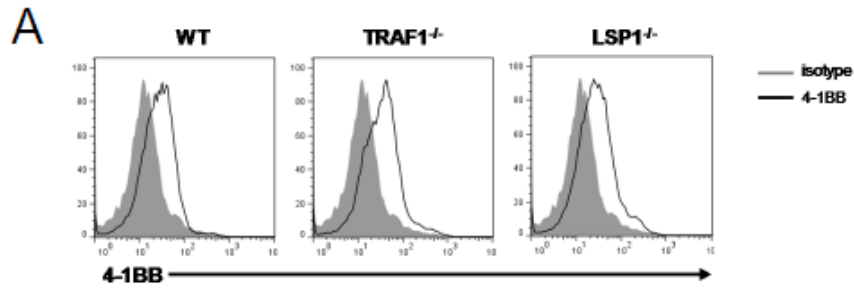


B



C





Supplementary Table 1. Identification of LSP1 within the 4-1BB signalling complex in T cells by LC-MS/MS

			Number of Unique Peptides (% coverage)					
Protein name	Accession Numbers (s)	M.W. ^a (kDa)	WT	TRAF1 ^{-/-}	WT	TRAF1 ^{-/-}	WT	TRAF1 ^{-/-}
			α -4-1BB 15 min	α -4-1BB 15 min	α -4-1BB 60 min	α -4-1BB 60 min	rat IgG 60 min	rat IgG 60 min
4-1BB	ENSMUSP00000030808 (+4)	28	2 (8%)	2 (8%)	2 (8%)	3 (16%)	2 (8%)	4 (21%)
LSP1	ENSMUSP00000018963 (+4)	37	4 (18%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)

^aM.W.,]molecular weight. The ENSEMBL *Mus musculus* release 49 sequence database was used for matching peak lists to peptide sequences. Commonly used protein names are listed with their accession numbers and molecular weight. The number of unique peptides and the percentage coverage of the protein are listed for each protein.

Supplementary Table 2. Identification of LSP1 within the TRAF1 signalling complex in T cells by LC-MS/MS

			Number of Unique Peptides (% coverage)			
Protein name	Accession Numbers (s)	M.W. ^a (kDa)	TRAF1 ^{-/-} α-4-1BB 60 min	WT rat IgG 60 min	WT α-4-1BB 15 min	WT α-4-1BB 60 min
TRAF1	ENSMUSP00000028234 (+1)	45	0 (0%)	19 (47%)	17 (44%)	15 (45%)
TRAF2	ENSMUSP00000028311 (+1)	56	0 (0%)	14 (28%)	13 (24%)	5 (10%)
LSP1	ENSMUSP00000018963 (+4)	37	0 (0%)	0 (0%)	3 (13%)	0 (0%)
cIAP1	ENSMUSP00000013949 (+1)	67	0 (0%)	2 (8%)	1 (5%)	0 (0%)
cIAP2	ENSMUSP00000091422	70	0 (0%)	9 (15%)	5 (8%)	2 (3%)

^aM.W., molecular weight. The ENSEMBL *Mus musculus* release 49 sequence database was used for matching peak lists to peptide sequences. Commonly used protein names are listed with their accession numbers and molecular weight. The number of unique peptides and the percentage coverage of the protein are listed for each protein.

3.2. Articles scientifique 2

TLR4 dependent induction of 4-1BB (CD137) surface expression in murine B cells

Daniela Andreeva et Laurent Sabbagh.

3.2.1. RÉSUMÉ

4-1BB (CD137) est un membre de la superfamille des TNFR qui est impliquée dans la transmission des signaux de survie dans les lymphocytes. Les TRAFs sont une famille de protéines adaptatrices impliquées dans la liaison des membres particuliers de la famille des TNFRs et les voies de signalisation en aval. Nous avons montré précédemment que TRAF1 est nécessaire en aval de 4-1BB pour activer la MAP kinase Erk impliquée dans la régulation négative de la molécule pro-apoptotique Bim et que LSP1 (Leucocyte Specific Protein 1) lie TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) en aval du récepteur 4-1BB dans les cellules T favorisant ainsi la survie des lymphocytes T. Il a été rapporté que le récepteur 4-1BB n'est pas exprimé dans des cellules B murines mais, que 4-1BB favorise la prolifération et la survie des cellules B humaines. Nous avons identifié que le récepteur 4-1BB est exprimé à la surface des cellules B de souris en réponse à une stimulation par le LPS (Lipopolysaccharide). Une caractérisation plus poussée a montré que le récepteur 4-1BB est induit dans les cellules B murines d'une manière TLR4-dépendante. Collectivement, notre travail a démontré que la stimulation avec le LPS conduit à l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B murines, conduit à l'induction de TRAF1 et que TRAF1 et LSP1 coopèrent en aval de 4-1BB pour activer la signalisation d'ERK d'une manière similaire aux cellules T. De plus, les cellules B déficientes en TRAF1 et les cellules B déficientes en LSP1 ne sont pas en mesure d'activer la voie ERK en aval de 4-1BB similairement aux lymphocytes T. Il est intéressant de noter que, l'expression du récepteur 4-1BB à la surface dans les cellules B de souris déficientes en TRAF1 ou LSP1 est significativement diminuée par rapport aux cellules B en provenance d'une souris WT. Ainsi, TRAF1 et LSP1 sont requises pour une expression maximale du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B murines et coopèrent en aval de 4-1BB afin d'activer la cascade ERK.

TLR4 dependent induction of 4-1BB (CD137) surface expression in murine B cells

Daniela Andreeva and Laurent Sabbagh.

ABSTRACT

4-1BB (CD137) is a member of the TNFRs superfamily that is involved in the transmission of survival signals in lymphocytes. TNFR-associated factors (TRAFs) are a family of adapter proteins involved in linking particular TNFR family members to downstream signaling pathways. TRAF1 is required downstream of 4-1BB to activate the MAP kinase Erk involved in the negative regulation of the pro-apoptotic molecule Bim. We have shown previously that Leukocyte-specific protein 1 (LSP1) links TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. It has been reported that the 4-1BB receptor is not expressed in murine B cells but 4-1BB promotes proliferation and survival of human B cells. We have identified that 4-1BB receptor is expressed on the surface of the murine B cells in response to LPS stimulation. Further characterization revealed that the 4-1BB receptor is induced in murine B cells in a TLR4-dependent manner. Collectively, our work demonstrated that LPS stimulation leads to 4-1BB surface expression in murine B cells, leads to the induction of TRAF1 and, TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB to activate ERK signaling in murine B cells similarly to T cells. Like TRAF1-deficient B cells, B cells deficient in LSP1 are not able to activate ERK pathway downstream of 4-1BB. Interestingly, the expression of the 4-1BB receptor on the surface of B cells from TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice is significantly decreased in comparison with WT. Thus, TRAF1 and LSP1 are required for maximal expression of 4-1BB receptor on the surface of murine B cells and cooperate downstream of 4-1BB in order to activate the ERK cascade in murine B cells.

Introduction

Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) are involved in the transmission of survival and death signals in lymphocytes. The balance between survival signals and death plays a critical role in T effector cells and the maintenance of memory T cells [1-2]. 4-1BB (CD137), a member of the TNFRs superfamily is predominantly found on activated T and NK cells and is involved in the transmission of survival signals in lymphocytes. 4-1BBL is expressed on APCs, including macrophages, dendritic cells, activated B cells and monocytes [3].

Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors (TRAFs) represent a family of intracellular adapter proteins involved in linking particular TNFR family members to downstream signaling pathways [4]. TRAF1 is an adapter protein that is recruited by 4-1BB and other TNFRs and is characterized by a very limited expression in lymphocytes, dendritic cells and some epithelial cells. TRAF1 is necessary downstream of 4-1BB for the expansion and survival of memory T cells *in vivo* [3, 5]. It has been demonstrated that in the absence of antigen *in vivo*, TRAF1 is required for the survival and maintenance of CD8 memory T cells. Additionally, TRAF1 is required to down-modulate the levels of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim, promoting survival of CD8 T cells [3].

We have previously shown that Leukocyte-specific protein 1 (LSP1) links TRAF1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells [9]. We identified that LSP1 is recruited to the signaling complex 4-1BB in a TRAF1-dependent manner. Further characterization of the interaction between TRAF1 and LSP1 showed that LSP1 directly binds the N-terminal region independently of the C-terminal conserved region. Like TRAF1-deficient T cells, T cells deficient in LSP1 are not able to activate ERK downstream of 4-1BB and therefore cannot regulate Bim levels. Thus, TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB in order to activate ERK and regulate Bim levels in CD8 T cells [9].

Several *in vitro* studies suggest that the 4-1BB/4-1BBL interaction plays an important role in cellular immune responses, and co-stimulation through 4-1BB/4-1BBL may be used as a target for immunotherapy of cancer [10]. It has been demonstrated that 4-1BB and 4-1BBL are co-expressed constitutively in human T and B leukemia cells. In addition, co-expression of both 4-1BB and 4-1BBL on the surface of leukemic T and B cells may confer a survival advantage to support cell growth, promote survival and contribute to drug resistance [11].

It has been reported that 4-1BB is not expressed in murine B cells [12] but the receptor is expressed and promotes proliferation and survival of human B cells [13]. However, why human B cells express on the surface 4-1BB following stimulation through the BCR (B Cell Receptor) and murine B cells do not, remains to be determined. In this report, we sought to identify signals that lead to expression of 4-1BB on the surface of murine CD19⁺ B cells. Initially, we demonstrated that 4-1BB is expressed on the surface of murine B cells in response to LPS (bacterial lipopolysaccharide) stimulation. Furthermore, we confirmed that 4-1BB is induced on murine B cells in a TLR4 (Toll Like receptor 4) dependent manner. In addition, stimulation of murine B cells with LPS leads to the induction of TRAF1. Interestingly, the expression of 4-1BB at the surface of B cells from TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice is significantly decreased in comparison with WT B cells. Indeed, TRAF1 and LSP1 cooperate downstream of 4-1BB to activate ERK signaling in murine B cells similarly to T cells. Like TRAF1-deficient B cells, B cells deficient in LSP1 are not able to activate ERK downstream of 4-1BB. Thus, TRAF1 and LSP1 are required for maximal expression of the 4-1BB receptor on the surface of murine B cells and cooperate downstream of 4-1BB in order to activate the ERK cascade in murine B cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, Quebec, Canada). TRAF1^{-/-} gene-targeted mice have been described [14]. LSP1^{-/-} gene-targeted mice have been described [15] and were kindly provided by Dr. Jenny Jongstra-Bilen (University Health Network, Toronto, Ontario, Canada).

Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in sterile microisolator caging. All mice studies were performed in accordance with the regulations of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were approved by the Maisonneuve-Rosemont animal care committee.

Lymphocytes isolation and stimulation

Murine B cells

Splenocytes were purified after red blood cell lysis of total spleen from C57BL/6 WT, TRAF1-deficient and LSP1-deficient mice using ammonium-chloride-potassium lysing buffer (ACK lysing buffer). Primary B cells from C57BL/6 WT, TRAF1-deficient and LSP1-deficient mouse spleens were isolated by negative depletion using magnetic bead separation. For B cell purification, we used Mouse B Cell Isolation Kit separation (EasySep; Stemcell Technologies, British Columbia, Canada). The isolated CD19⁺ B cells were cultured (1x10⁶ cells/ml) in complete RPMI medium (RPMI 1640 with L-glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin 10000 units/mL, 1% streptomycin 10000 ug/mL, 0.1% β-2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acids (NEAA) 100X, 1% sodium pyruvate 200mM, and 1% HEPES 1M). Flow cytometry analysis confirmed that the purity of live CD19⁺ B cells was >90%.

Anti-CD40/IgM stimulation of murine CD19⁺ B cells

CD19⁺ B cells were stimulated with 5μg/ml anti-CD40 in the absence or presence of anti-IgM (AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μChain Specific; Jackson Immuno Research; 10μg/ml) or NIH 3T3-SAMEN or CD40L expressing NIH 3T3-CD40L (provided by Dr. N. Labrecque).

LPS stimulation and TLR4 signaling inhibition

Purified B cells (1×10^6 /ml) were cultured in 6-well plates with LPS from *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich; $1 \mu\text{g/ml}$) in the absence or presence of LPS inhibitor: LPS-RS (Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides*-TLR4 antagonist, Invivo Gen; $100 \mu\text{g/ml}$) for 3 days. For inhibitor treatment, B cells were cultured with inhibitor for 1h30 before LPS was added: inhibitor was maintained in the medium during the LPS culture period.

Analysis of B cell survival, activation and cell surface markers was performed by flow cytometry as described below. Once the phenotype of B cells was confirmed, activated CD19 B cells were stimulated with $10 \mu\text{g/ml}$ control rat IgG antibody or agonistic anti-4-1BB antibody (clone 3H3). The number of live cells in the cultures was determined by Trypan blue exclusion.

Antibodies and reagents

Murine B cells were surface-stained with PE labeled anti-CD19 antibody (BD Bioscience); biotin anti-4-1BB with allophycocyanin (APC) labeled streptavidin and relevant isotype control IgG1 (BD Bioscience); biotin anti-4-1BBL with allophycocyanin (APC) labeled streptavidin and relevant isotype control IgG1 (BD Bioscience); PE labeled anti-TLR4 antibody (eBioscience) FITC labeled anti-CD40 antibody (eBioscience) and PE labeled anti-CD86 antibody (BD Bioscience).

Flow Cytometry

FACS data obtained by FACSCalibur (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA) were analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Western blot analysis

Purified CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} or LSP1^{-/-} mice were stimulated with $1 \mu\text{g/ml}$ LPS in the absence or presence of $100 \mu\text{g/ml}$ inhibitor of LPS (LPS-RS) for 24h and 48h. At the time point indicated, aliquots of 10^6 CD19⁺ B cells were harvested from cell cultures, centrifuged and stored at -20°C until analysis. After thawing, cell pellets were lysed in Tris buffer saline containing 0.4mM EDTA, 1% NP40, and the complete protease inhibitors cocktail for 30

minutes on ice. After centrifugation, the cell lysates were subjected to SDS-PAGE following by transfer to PVDF membranes (Pall Life Sciences, Mississauga, ON, Canada). The membranes were blocked in TBS-T (Tris-buffered saline supplemented with 0.05% Tween20) with 5% skim milk and probed overnight with gentle shaking using specific antibodies for murine TRAF1(Santa Cruz Biotechnology), murine LSP1 (Cell Signaling Technology), murine pERK1/2(pT202/pY204; (Cell Signaling Technology, Whitby, Ontario, Canada), murine ERK1/2(Cell Signaling Technology, Whitby, Ontario, Canada), or β -actin (Sigma). Membranes were washed 3 times in TBS-T and incubated with the HRP-conjugated anti-rabbit or anti-rat Ig antibody (Sigma). Exposure time for WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} blots were identical, as image was acquired at the same time. The signal was revealed using the Amersham ECL detection system (GE Healthcare Life Science) and digital image were acquired using the Image Quant LAS 4000 bio molecular imager (GE Healthcare Life Science). The intensity of the bands of interest was determined using the Multi Gauge software version 2.3 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Quantification was determined by normalizing the signal intensity of pERK1/2 to total ERK1/2.

RESULTS

Expression of 4-1BB receptor and 4-1BBL on non-activated and activated murine B cells

We first examined the expression of 4-1BB and 4-1BBL on splenic murine B cells by flow cytometry. 4-1BB receptor is induced in T cells upon activation through the TCR and costimulation [13] or in the presence of cytokines [4]. In human B cells, 4-1BB receptor is induced upon activation through the BCR [10]. To identify which signals lead to the expression of 4-1BB receptor at the surface of murine B cells, we used different stimulations upon activation through the BCR of primary murine B cells. To activate B cells, we used the combination of anti-IgM and anti-CD40 Abs. Purified splenic CD19⁺ B cells from WT mice were stimulated with anti-CD40 mAb in absence or presence of anti-IgM for 24h, 48h and 72h and stained with anti-mouse 4-1BB mAb and anti-mouse 4-1BBL mAb. As shown in figure 1 (A), (B) and (C), 4-1BB and 4-1BBL expression was not found on non-stimulated splenic murine CD19⁺ B cells at days 0, 24h, 48h and 72h after isolation. Stimulation with anti-CD40 mAb alone or anti-IgM/anti-CD40 did not induce 4-1BB expression at the surface of murine B cells at 24h, 48h or 72h after stimulation (Fig. 1B). However, stimulation with anti-IgM/anti-CD40 induced 4-1BBL expression which appeared at 48h after stimulation and reached a peak at 72h (Fig. 1C). In contrast, stimulation with anti-CD40 mAb alone did not induce 4-1BBL expression (Fig. 1C). We also examined the induction of 4-1BB and 4-1BBL at 48h and 72h after stimulation using CD40L-expressing murine fibroblasts cells line (NIH 3T3-CD40L). Co-culture with NIH 3T3-CD40L cells, but not with parental NIH 3T3-SAMEN could significantly induce 4-1BBL expression on splenic murine B cells (Fig 1D). Moreover, addition of an anti-IgM leads to a higher expression of 4-1BBL on murine B cells in comparison with stimulation with NIH 3T3-CD40L cells alone. In contrast, 4-1BB was not found on murine B cells when stimulated with parental NIH 3T3-SAMEN; CD40L-expressing murine fibroblasts cells (NIH 3T3-CD40L) or (NIH 3T3-CD40L+anti-IgM) (Fig. 1D). These results demonstrate that 4-1BB is not induced on murine B cells under these stimulation conditions, while 4-1BBL is

specifically expressed on the surface when stimulated with anti-IgM/anti-CD40, or in co-culture with (NIH 3T3-CD40L) or (NIH 3T3-CD40L+anti-IgM).

LPS mediated 4-1BB expression on murine B cells

Next, we examined the inducibility of 4-1BB by other stimuli for murine B cells such as LPS. We used LPSs -a known T-independent stimulus for the activation of B cells. [20]. Purified splenic CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice were stimulated with 1µg/ml LPS and the cells were cultured for 24h, 48h and 72h. At the time points indicated, the surface expression levels of 4-1BB on murine B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice was determined by flow cytometry. At first we confirmed that isolated CD19⁺ B cells did express TLR4, the receptor for LPS. As shown Fig.2, LPS stimulation induced 4-1BB expression at the surface of murine B cells. However, B cells stimulated with LPS alone did not up regulate 4-1BB. At 24h, CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice were found to express CD86 and CD40 uniformly on the cell surface. Thus, the absence of TRAF1 and LSP1 had no impact on CD40 and CD86 expression. A minor variation in the expression of TLR4 on B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice was detected at Day 0 (Fig.2A, B, C) and 24h after stimulation (Fig.3A, B, C). Additionally, the expression of 4-1BB receptor at the surface of LPS activated B cells from TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice was significantly lower in comparison with WT. These results suggest that LPS stimulation is able to induce 4-1BB expression at the surface of murine B cells, and both TRAF1 and LSP1 are required for maximal expression of 4-1BB on murine B cells.

TLR4 signaling provides a first level of regulatory control for 4-1BB surface expression on murine B cells

B cells express several proteins of the TLR (Toll-like receptor) family and recognize and respond to pathogen-associated ligands. These innate signals have an important role in the B cell adaptive immune response. LPS (bacterial lipopolysaccharide) is a potent activator of the immune system and is the major component of the wall of all Gram-negative bacteria. TLR4 is the receptor for LPS and is expressed in complex with MD2 at the B cell surface [16]. To determine if induction of 4-1BB receptor on the surface on murine B cells is dependent on TLR4

activation, we used a commercial inhibitor of TLR4 (LPS-RS) in order to block signaling downstream of TLR4. Purified CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} or LSP1^{-/-} mice were stimulated with 1 µg/ml LPS in absence or presence of 100µg/ml inhibitor of LPS (LPS-RS) for 24h and 48h. At the time points indicated, the surface expression levels of 4-1BB on murine B cells was confirmed by flow cytometry. As shown in Fig.3, 4-1BB is expressed on murine B cells following LPS stimulation and expression is regulated by TLR4 activation. The addition of the inhibitor of LPS leads to a loss of expression of TLR4 and accordingly to a loss of the expression of 4-1BB receptor on the surface of murine B cells. B cells from WT mice express high levels of 4-1BB receptor compared to B cells deficient in TRAF1 or LSP1 at 24h and 48h, as shown in Fig.3A, B and C. At 48h, B cells from WT mice show increased expression of 4-1BB receptor in presence of LPS compared to B cells from TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice. These findings indicate that exposure to LPS is required for 4-1BB expression, and TLR4 signaling provides a first level of regulatory control for 4-1BB expression on murine B cells.

LPS induces TRAF1 expression but not LSP1 in murine B cells

We and others have previously shown that TRAF1 plays a central role downstream of 4-1BB [5, 17]. Additionally, we showed that LSP1 binds directly the N-terminal region independently of the C-terminal conserved region of TRAF1 [9]. Given our current finding that 4-1BB is expressed on the surface of B cells following LPS stimulation, we sought to investigate whether activation with LPS leads to an induction of expression of TRAF1 and LSP1 in murine B cells. To demonstrate that induction of TRAF1 in murine B cells is dependent of TLR4 activation, we used a commercial inhibitor of TLR4 (LPS-RS) in order to block the cascade downstream of TLR4. Purified CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} or LSP1^{-/-} mice were stimulated with 1 µg/ml LPS in absence or presence of 100µg/ml inhibitor of LPS (LPS-RS) for 24h and 48h. At the time point indicated, cells were lysed and subjected to Western Blot analysis. This approach allowed us to demonstrate that TRAF1 is not expressed in non-stimulated B lymphocytes, but can be induced upon activation with LPS. As shown in Fig.4A, TRAF1 is induced in murine B cells following LPS stimulation at 24h and 48h and induction is regulated by TLR4 activation. The addition of the inhibitor of LPS leads to a loss of induction of TRAF1 expression in murine B cells. In contrast, LPS stimulation and addition of inhibitor of LPS have no effects on the expression of LSP1 in murine B cells (Fig.4B).

The absence of TRAF1 and LSP1 in murine B cells leads to defective ERK activation downstream of 4-1BB signaling

We investigated the contribution of TRAF1 and LSP1 to ERK activation downstream of 4-1BB receptor in murine B cells. 4-1BB is a TRAF1 binding receptor and the association is important for CD8 T cells [6, 17]. We have previously demonstrated that TRAF1 is required downstream of 4-1BB for the activation of ERK and Bim down-modulation in CD8 T cells [5]. Additionally, we have previously shown that LSP1 is recruited to the 4-1BB complex in the T cells in a TRAF1 dependent manner, and the direct interactions between TRAF1 and LSP1 required the TRAF-N domain of TRAF1. Moreover, the cooperation between TRAF1 and LSP1 is required to activate the ERK cascade which leads to a down-modulation of the levels of the pro-apoptotic molecule Bim, and enhances T cell survival downstream of 4-1BB [9]. To examine the requirement for TRAF1 and LSP1 during 4-1BB dependent responses in murine B cells, WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} CD19⁺ B cells were activated with LPS. By 48h after activation, CD19⁺ B cells from WT mice express high levels of 4-1BB receptor compared to B cells deficient in TRAF1 or LSP1 as shown in Figure 3. Subsequently, B cells from each genotype were stimulated with an agonistic anti-4-1BB antibody or a rat IgG control. ERK activation was determined at different time points by Western blot analysis. As we have shown previously [9] in the absence of TRAF1 and LSP1 in murine CD8 T cells, activation of ERK is defective following 4-1BB stimulation compared to CD8 T cells from WT mice. As shown in Figure 5B and C, a comparable defect in ERK activation downstream of 4-1BB is observed in TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} CD19⁺ B cells following 4-1BB stimulation compared to CD19 B cells from WT mice (Fig.5A). This finding is in agreement with our previous study [9] that TRAF1 and LSP1 cooperate and are required downstream of 4-1BB to activate the ERK cascade in CD8 T cells.

DISCUSSION

B cells play a central role in the adaptive immune response to pathogens. Antigenic recognition through the B cell receptor (BCR) leads to the activation and differentiation of B cells. Additionally, B cells express at the cell surface several proteins of the TLR family and recognize and respond to pathogen-associated ligands. Although these signaling pathways are well studied, little is known about the mechanism involved in the activation of TLR4, followed by induction of the surface expression of TNFRs on B cells.

In the present study, we examined the expression of 4-1BB on murine B cells. 4-1BB expression has been investigated on a variety of immune cells including activated T cells, activated human B cells [13], neutrophils [29, 30], dendritic cells [12], natural killer cells [31], eosinophils [32] and mast cells [33], but expression and function on murine B cells remains to be elucidated. Here, we report that murine B cells stimulated with LPS leads to the induction of 4-1BB surface expression. It has been reported that 4-1BB (CD137) promotes proliferation and survival of human B cells [13], but 4-1BB receptor is not expressed at the surface of murine B cells [12]. The induction of 4-1BB on murine B cells by LPS represents a first report of the expression of this receptor on the surface of murine B cells.

We have previously demonstrated that LSP1 is recruited to the 4-1BB signaling complex in a TRAF1-dependent manner and direct interactions between TRAF1 and LSP1 lead to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells [9]. In this study, we show that 4-1BB appears not to be expressed on murine B cells upon BCR stimulation (Fig.1) but exposure to LPS leads to the induction of 4-1BB surface expression in a TLR4 dependent manner (Fig.2 and Fig.3). We have previously demonstrated that the absence of TRAF1 or LSP1 had no impact on 4-1BB surface expression on activated murine CD8 T cells [9]. Notably, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} B cells show up-regulation of surface molecules such as 4-1BB in response to LPS stimulation and we observed that the absence of TRAF1 or LSP1 in murine CD19⁺ B cells leads to a reduction of expression of 4-1BB receptor in comparison with WT B cells (Fig 2A, B and C). These findings suggest that TRAF1 and LSP1 are required for maximal 4-1BB surface expression on murine B cells. Then, we looked if the expression of 4-1BB receptor is TLR4

dependent. TLR4 is the receptor for LPS and is expressed in complex with MD2 at the murine B cell surface [16]. We impaired TLR4 activation with the inhibitor of LPS which blocks the activity of TLR4. Two different blocking mechanisms are targeted by this inhibitor. When we looked at the expression of 4-1BB in LPS activated murine B cells, we observed increased surface expression in comparison with LPS activated B cells incubated with the inhibitor of LPS (Fig.3A, B and C). These findings demonstrate that TLR4 signaling up regulates 4-1BB surface expression on murine B cells. Because 4-1BB expression on murine B cells was induced upon LPS activation, we sought to determine whether the induction of TRAF1 or LSP1 was dependent of TLR4 activation. When we looked at the induction of TRAF1 and LSP1 in LPS activated murine B cells, we observed increased protein expression levels in total lysates of TRAF1 but not LSP1 (Fig.4A and B). Addition of the inhibitor of LPS leads to a loss of expression of TRAF1 in murine B cells. (Fig.4A). Indeed, TRAF1 is not expressed in non-stimulated murine B cells (Fig.4A), but can be induced upon activation with LPS and these findings confirm that TRAF1 induction is dependent on TLR4 activation in murine B cells.

Taken together, these findings demonstrate that following activation of TLR4 by LPS, 4-1BB receptor is expressed on the surface of murine B cells and leads to the induction of expression of TRAF1.

Interestingly, anti-IgM/anti-CD40 stimulation leading to induction of expression of 4-1BB receptor on the surface of human B cells triggers the expression of the natural ligand of 4-1BB receptor, 4-1BBL on the surface of murine B cells.

It has been shown that in B cells, LSP1 is associated with MEK1 and the activation of LSP1-associated MEK1 is dependent on cross-linking of surface IgM which leads to the activation (phosphorylation) of ERK2[28]. Our previous study already demonstrated that direct interactions between TRAF1 and LSP1 lead to the activation of the ERK cascade downstream of 4-1BB in murine CD8⁺ T cells. [9]. Additionally, we have demonstrated that the TRAF-N domain is required for direct interactions with LSP1 and the absence of TRAF1 or LSP1 in T cells result in a defect in the activation of the ERK pathways upon 4-1BB cross-linking, defective down-modulation of Bim levels and reduction of T cell survival [9]. Similarly to T cells, murine B cells from WT mice (Fig.5A) are able to phosphorylate ERK downstream of 4-1BB in contrast to B cells from TRAF1^{-/-} or LSP1^{-/-} mice (Fig.5B and C). Therefore, in the absence of TRAF1 or LSP1

in murine B cells, ERK activation downstream of 4-1BB is compromised. It has been reported that ERK has an important function in cell migration [22] as well as in TLR signaling in immune cells [21]. *Barrio et al*, reported that when B cells are stimulated through TLR4 with LPS, the activation of ERK1/2 is detected with a maximum level at 15 min after stimulation and returns to a basal levels at 1h [23]. When murine B cells are stimulated with LPS for 48h followed by stimulation with agonistic anti-4-1BB antibody or control rat IgG, we did not observe a difference in the survival of stimulated B cells with anti-4-1BB or control rat IgG at 24h vs. 48h stimulations (data not shown).

Despite the absence of BCR stimulation, both naïve and memory murine B cells respond to TLR4 stimulation *in vitro* equally [19]. Several studies on TLR4 expression in murine B cells demonstrate a pattern slightly different from that found in human B cells [19]. In our study, LPS stimulation did not lead to the surface expression of 4-1BB on human CD19⁺ B cells from healthy donors at 24h, 48h and 72h after addition of LPS (data not shown) in contrast to murine B cells (Fig.2A, B, C; and Fig.3A,B, C). It has been reported that human B cells do not respond to the activation of LPS, because they lack TLR4 [24] in contrast to murine B cells. Additionally, ligands for TLR2 or TLR9 induce TLR4 expression on human B cells [24]. The inability to be activated by LPS stimulation is a hallmark of normal human B cells [19]. However, it has been reported that human B cells from healthy donors express little or no surface TLR4 receptor [25; 26 and 27]. Interestingly, it was reported that TLR4 is expressed in B cell malignancies with unexpected functions [19]. It has been reported that 99% of peripheral B cells from patients with inflammatory diseases express TLR4 receptor [25] and these data suggest that unidentified mechanisms promote TLR4 expression on the surface on human B cells. It is possible that higher concentrations or repeated or prolonged exposure to a combination of TLR ligands and BCR stimulation induce TLR4 expression on the surface of human B cells. Importantly, published work has shown that classical human B cell stimulation through CD40 and Ig, in combination with IL-4 maximally increases the TLR4 surface expression on human B cells and patients with inflammatory disease naturally maintain high levels of B cell activators that could promote surface TLR4 expression on human B cells [35]. Moreover, *Zhang et al*, [13] demonstrated that 4-1BB is induced on human B cells following BCR stimulation (anti-CD40/anti Ig) and that expression levels are enhanced by interactions between CD40L and CD40. However, the same stimulation signals anti-CD40/anti-Ig lead to the expression of 4-1BB [13] and TLR4 [35] on

the surface of human B cells suggesting that the cascade described previously [9] in T cells and the findings in this study may be implicated in survival signals that promote enhanced proliferation and survival of human B cells through 4-1BB/4-1BBL signaling and may be implicated in B cells malignancy. It has been reported that 4-1BB and 4-1BBL are constitutively coexpressed in human T and B leukemia cells and promote proliferation and survival [10]. Moreover, 4-1BB/4-1BBL interactions protect Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) B cells from spontaneous apoptosis [18]. Given our current finding that 4-1BB is expressed on the surface of murine B cells following LPS stimulation, it is important to verify whether human B cells that express surface TLR4 express 4-1BB receptor as well. It is possible that prolonged exposure to TLR4 ligands leads to the expression of 4-1BB receptor on the surface of human B cells followed by activation of cascade downstream of 4-1BB described previously [9] and leads to an increased accumulation of B cells which can lead to chronic diseases such as CLL. Further studies are needed to address this possibility.

Interestingly, overexpression of 4-1BB and TRAF1 in several tumors of B cells origin (leukemia and lymphoma) suggests that 4-1BB and TRAF1 play an important role in cell survival and could play a role in hematologic malignancies. Individuals with chronic lymphocytic leukemia (CLL) whose cells express the highest levels of TRAF1 are resistant to treatment [8]. This suggests that elevated levels of 4-1BB and TRAF1 give a more increased cell survival advantage. LSP1 is also overexpressed in Hodgkin's disease and is associated with Non-Hodgkin lymphoma, similarly to TRAF1 [34]. A better understanding of the mechanisms controlling the survival of healthy and malignant B cells will define the therapeutic targeting of 4-1BB, TLR4 or TRAF1 and LSP1 in B cell malignancy.

REFERENCES

1. DeBenedette, M.A., Shahinian, T.W.Mak, and T.H.Watts (1997) Costimulation of CD28-T lymphocytes by 4-1BBL.*J.Immunol.***158**: 551-559.
2. Polok, K.E., Y.J.Kim, J.Hurtado, Z.Hhou,K.K.Kim,, and B.S.Kwon.(1994) 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages,and costimulated anti- μ -primed splenic B cells. *Eur.J.Immunol.* **24**: 367-374.
3. Sabbagh, L., Srokowski, C.C., Pulle, G., Snell, L.M., Sedgmem, B.J., Liu, Y., Tsitsikov, E.N., Watts, T.H. (2006) A critical role of TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **103**, 18703-18708.
4. Xie, P., (2013) TRAF molecules in cell signaling and in human diseases, *Journal of Molecular Signaling*, 8:7
5. Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov,E. N., Watts, T.H., (2008) ERK dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo.*J.immunol.* **180**, 8093-8101.
6. Pulle,G., Vidric, M.,Watts,T.H. (2006) Il-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen independent CD8 memory T cell survival. *J.Immunol.***176**, 2739-2748.
7. Zapata, J.M., Reed, J.C. (2002) TRAF1: lord without a RING. *Sci. STKE* **2002**,PE27
8. Zapata, J.M., Krajewska, M., Krajewski, S.,Kitada, S., Welsh, K., Monks, A., McCloskey, N., Gordon, J., Kipps, T.J., Gascoyne, R.D., Shabaik, A., Reed, J.C., (2000) TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoide malignancies. *J.Immunol.* **165**, 5084-5096.
9. Sabbagh, L., Andreeva, D., Dubeau-Laramée, G., Oussa, E. N.A., Lew, D., Bisson,N., Soumounou, Y., Pawson, T., and Watts,T.H., (2013) Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 93, 713-721.
10. Palma C., Binaschi M., Bigioni M., Maggi C.A., Goso C.(2003) CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer.*; 108(3):390-398.
11. Cheuk, A. TC, Mufti, G.J., and Guinn,B., (2004) Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy, *Cancer gene Therapy* **11**, 215-226.
12. Futagawa, T., Akiba,H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., Okumura, K., (2002) Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells, *International Immunology*, Vol **14**, #**3**, 275-286.
13. Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin,W.,Li, G., Burche, E., Tan, M., Herzano, R., Chapoval,A.I., Tamada,K., Gasttman,B.R., Schulze, D.H., and Strome, S.E. (2010) CD137 Promote proliferation and survival of human B cells, *The Journal of Immunology* **184** : 787-795.
14. Tsitsikov, E.N., Laouini, D., Dunn, I.F., Sannikova,T.Y., Davidson,L., Alt, F.W., Geha, R.S. (2001) TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. Enhanced TNF signalingin TRAF1-deficient mice. *Immunity* **15**, 647-657.
15. Jongstra-Bilen, J., Misener, V.L., Wang, C., Ginzberg, H., Auerbach, A., Joyner, A.L., Downey, G.P., Jongstra, J. (2000) LSP1 modulated leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum, *Blood* **96**, 1827-1835.
16. Rawlings,D.J., M.A. Schwartz., S.W. Jackson, and A.Meyer-Bahlburg (2012) Integration of B cell response trough Toll-like receptor and antigen receptors, *Nat.rev.Immunol*, **12**: 282-294.
17. Takahashi, C., Mittler, R.S., Vella, A.T. (1999) Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J.Immunol.* **162**, 5037-5040.

18. Nakaima, Y., Watanabe, K., Koyama, T., Miura, O. and Fukuda T. (2013) CD137 is induced by the CD40 signal on chronic lymphocytic leukemia B cell and transduced the survival signal via NF- κ B activation. *PLoS ONE* **8** (5) : e64425.
19. Chiron, D, Bekeredjian-Ding, I., Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R. and Jegou, G. (2008) Toll-like receptors : lessons to learn from normal and malignant human B cells, *Blood*, **112**:2205-2213.
20. Parekh, V.V., Prasad, V.R., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A. and Mishra, G. (2003) B cell activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-Cd40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF- β 1, *J. Immunol*, **170**:5897-5911.
21. Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11** : 373-384.
22. Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M.D. (2004) MAP kinases and cell migration, *J. Cell Sci.* **117**: 4619-4628.
23. Barrio, L., Saez de Guinoa, J., and Carrasco, Y.R., (2013) TLR4 signaling shapes B cell dynamics via MyD88-dependent pathways and Rac GTPases. *The Journal of Immunology*, 191(7):3867-75.
24. Jagannathan, M., Hasrurk, H., Liang, Y., Shin, H., Hetzel, J.T., Kantarci, A., Rubin, D., McDonnell, M.E., Van Dyke, T.E., Ganley-Leal, L.M., Nikolajczyk, B.S., (2009) TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients, *J. Immunol*; **183**: 7461-7470.
25. Shin, H., Zhang, Y., Jagannathan, M., Hasturk, H., Kantarci, A., Liu, H., VanDyke, T.E., Ganley-Leal, L. M., Nikolajczyk, B.S. (2009) B cells from periodontal disease patients express surface Toll-like receptor 4, *J. Leukoc. Biol.*; **85**:648-655.
26. Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., Mantovani, A. (2003) The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells, *Blood*; **102**:956-963.
27. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., Van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J. Immunol*, **164** : 5998-6004.
28. Harrison, R.E., Sikorski, B.A., Jongstra, J. (2004) Leukocyte-specific protein 1 targets the EKR/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* **117**: 2151-2157.
29. Lee, S.C., Ju, S.A., Paek, H.N., Heo, S.K., Suh, J.H., Park, S.M.B., Choi, K., Kwon, B.S., Kim, B.S. (2005) 4-1BB (CD137) is required for rapid clearance of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immunol.* **73**; 5144-5151.
30. Nguyen, Q.T., Nguyen, T.H.T., Ju, S.A., Lee, Y.S., Han, S.H., Lee, S.C., Kwon, B.S., Yu, R., Kim, G.Y., Lee, B.J. and Kim, B.S. (2013) CD137 expressed on neutrophils plays dual roles in antibacterial responses against gram-positive and gram-negative bacterial infections. *Infection and Immunity*, **81**(6): 2168-2177.
31. Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., Chen, L. (1998) NK 1.1 cells express 4-1BB (CD137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by 4-1BB monoclonal antibodies. *Cell. Immunol.* **190** : 167-172.
32. Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Mittler, R.S., Yagita, H., Ueno, H. (2005) Engagement of 4-1BB inhibits the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *J. Immunol.* : 4897-4903.
33. Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., Croft, M., Kawakami, T. (2005) Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high affinity IgE receptor. *Blood*, 106: 4241-4248.

34. Cerhan, J. R., Ansell, S.M., Fredericksen ,Z.S., Kay ,N.E., Liebow, M., Call, T.G., Dogan ,A., Cunningham, J.M., Wang, A.H, Liu-Mares, W., Macon, W.R., Jelinek, D., Witzig, T.E., Habermann, T.M., and Slager,S.L, (2007) Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **110**, 4455-4463 .
35. Ganley-Leal, L.M., Liang, Y.M., Jagannathan-Bogdan, M., Farraye, F.A. and Nikolajczyk, B.S. (2010) Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol.Immunol.* **48(1-3)** : 82-88.

LEGENDS

Figure 1. Expression of 4-1BB and 4-1BBL on murine B cells. B cells were isolated from WT mice. The purity of B cells, 4-1BB or 4-1BBL surface expression on CD19⁺ B cells at days 0, 24h, 48h and 72h was determined by flow cytometry. (A) Murine CD19⁺ B cells non stimulated at day 0. (B) and (C) B cells were stimulated with 5 µg/ml anti-CD40 antibody or both anti-CD40 and anti-IgM (10 µg/ml) for 24h, 48h and 72h. (D) CD19⁺ B cells were stimulated with NIH 3T3-SAMEN (negative control); NIH 3T3-CD40L and NIH 3T3-CD40L+anti-IgM (10µg/ml) for 48h and 72h. Surface expression levels of 4-1BB and 4-1BBL were confirmed by flow cytometry.

Figure 2. Induction of 4-1BB expression in murine CD19⁺ B cells following LPS stimulation. B cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice. The purity of B cells was determined by flow cytometry. (A), (C), and (E) Murine CD19⁺ B cells unstimulated at day 0. Surface expression levels of CD40 and TLR4 in gated CD19⁺ were confirmed by flow cytometry. (B), (D) and (F) CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice were stimulated with 1 µg/ml LPS for 24h, 48h and 72h. Surface expression levels of CD40, CD86, TLR4 and 4-1BBL at 24h, and 24h,48h and 72h for 4-1BB was confirmed by flow cytometry.

Figure 3. TLR4 dependent induction of 4-1BB expression in murine B cells. CD19⁺ B cells from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice were cultured with LPS from *Escherichia coli*, 1µg/ml) in the absence or presence of inhibitor LPS-RS for 24h and 48h. The purity of B cells was determined by flow cytometry. Surface expression levels of 4-1BB and TLR4 in gated CD19⁺ stimulated WT murine B cells (A), in stimulated B cells from TRAF1^{-/-} (B) and LSP1^{-/-} (C) mice at the 24h and 48h was confirmed by flow cytometry.

Figure 4. Induction of TRAF1 expression in murine CD19⁺ B cells following LPS stimulation. CD19 B cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice and were stimulated with 1 µg/ml LPS in presence or absence of 100 µg/ml inhibitor of LPS (LPS-RS) for 24h and 48h. Cells were then lysed at the indicated time-points, and the levels of TRAF1 (A), LSP1 (B) and actin were determined in total lysates by Western blot analysis.

Figure 5. The absence of TRAF1 and LSP1 in murine CD19 B cells leads to defective ERK activation downstream of 4-1BB signaling. B cells were isolated from WT, TRAF1^{-/-} and LSP1^{-/-} mice and stimulated with 1 µg/ml LPS for 48h. Cells were then stimulated with anti-4-1BB (10µg/ml) or control rat IgG for the indicated time-points and lysed. The levels of pERK1/2 and total ERK were determined by Western blot analysis in WT (A), TRAF1^{-/-} (B) and LSP1^{-/-} (C) CD19⁺ B cells. The ratio of pERK1/2:ERK1/2 levels in anti-4-1BB stimulated B cells are shown (Representative of 3 experiments).

FIGURES

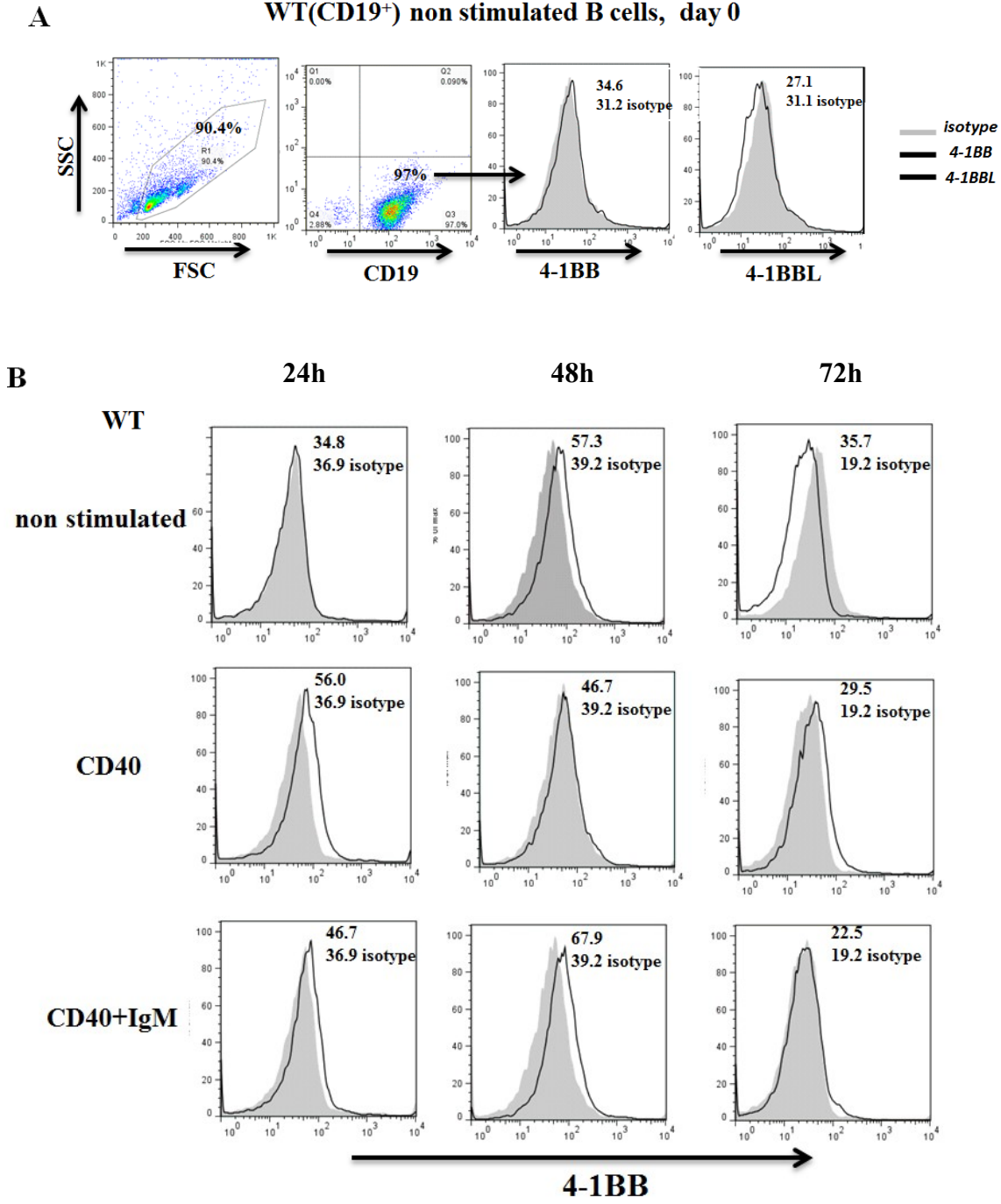
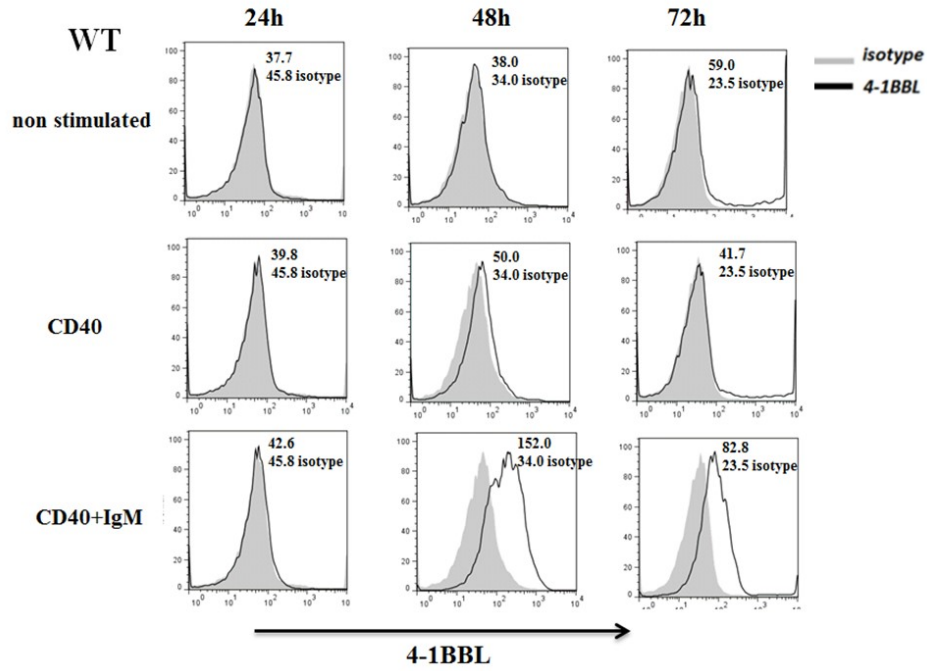


Figure 1. Expression of 4-1BB and 4-1BBL on murine B cells.

C



D

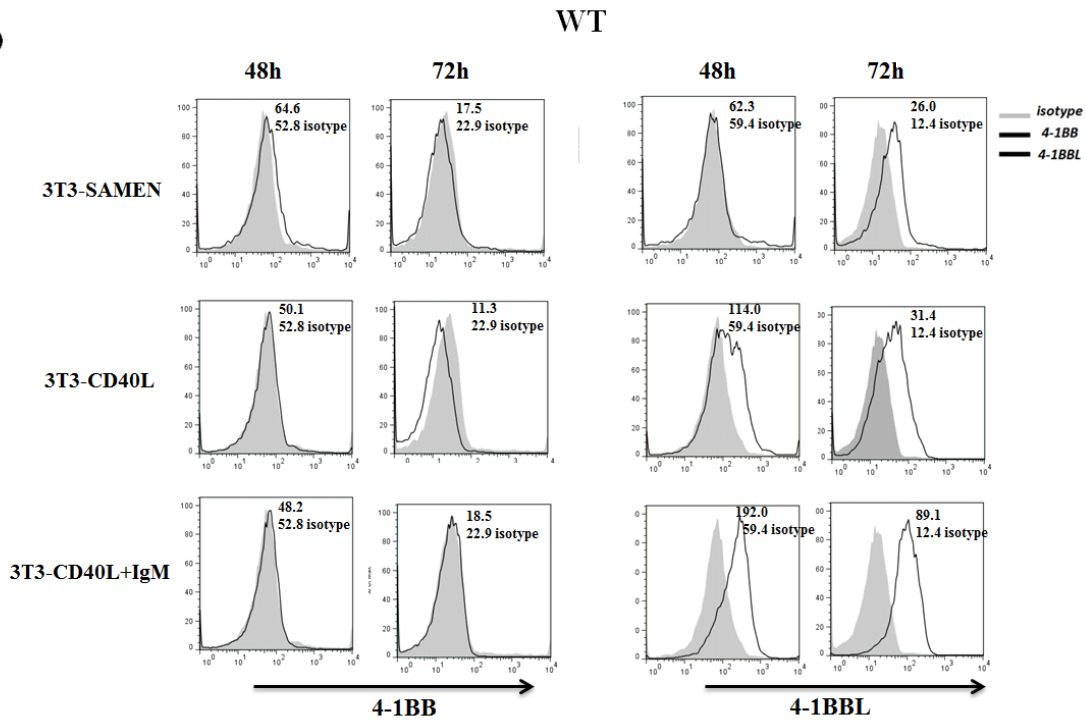


Figure 1. Expression of 4-1BB and 4-1BBL on murine B cells.

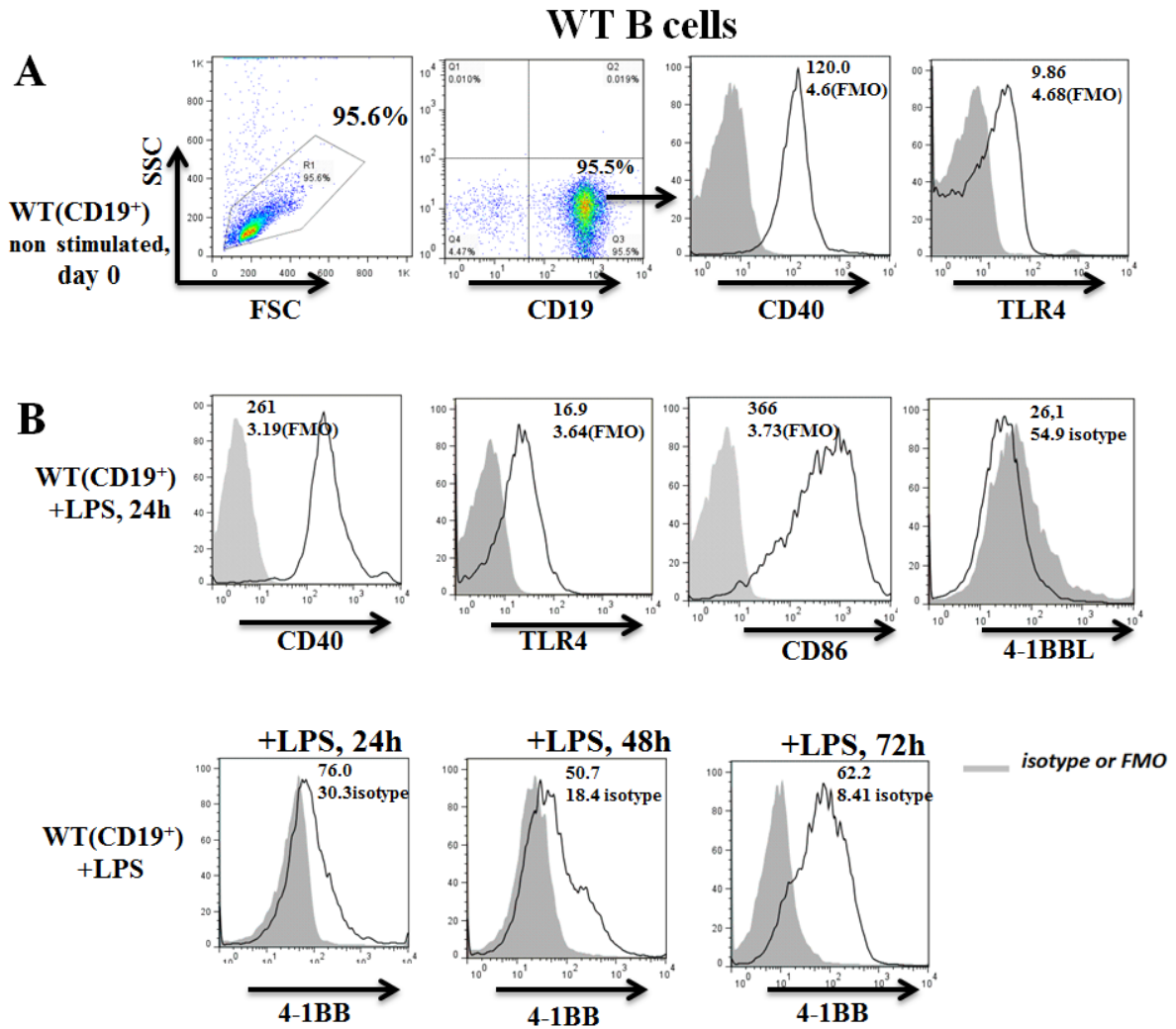


Figure 2. Induction of 4-1BB expression in murine CD19⁺ B cells following LPS stimulation.

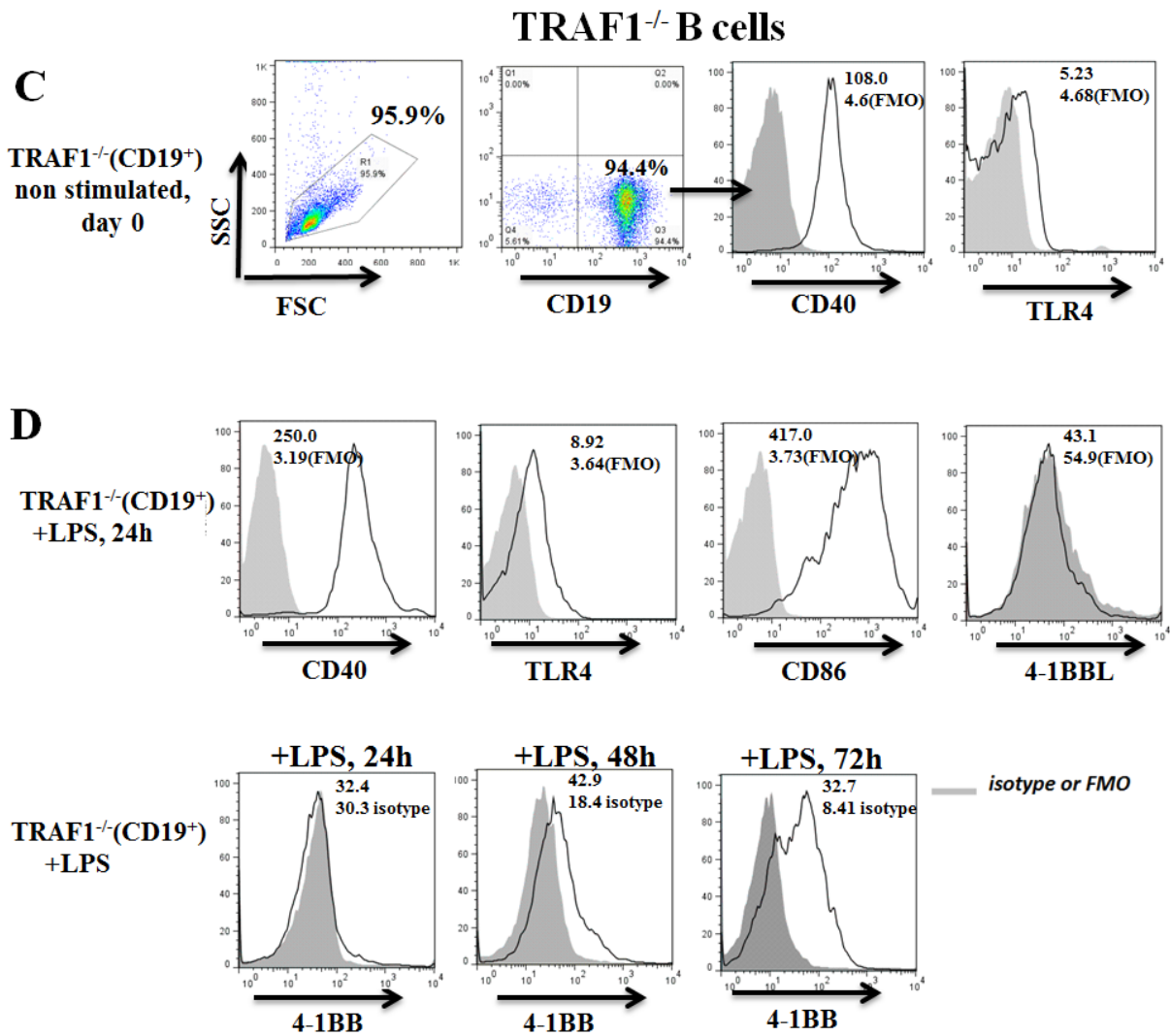


Figure 2. Induction of 4-1BB expression in murine CD19⁺ B cells following LPS stimulation.

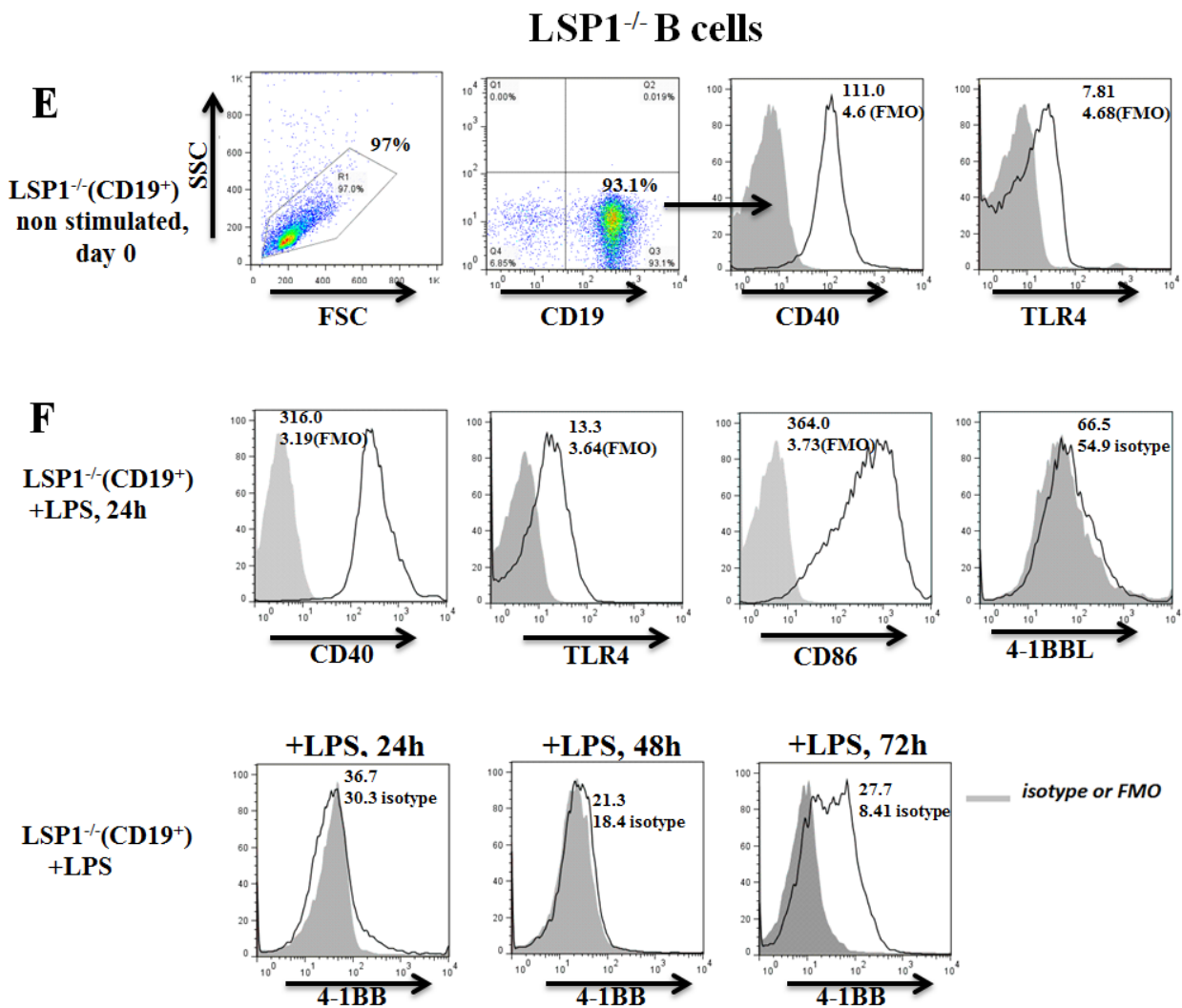


Figure 2. Induction of 4-1BB expression in murine CD19⁺ B cells following LPS stimulation.

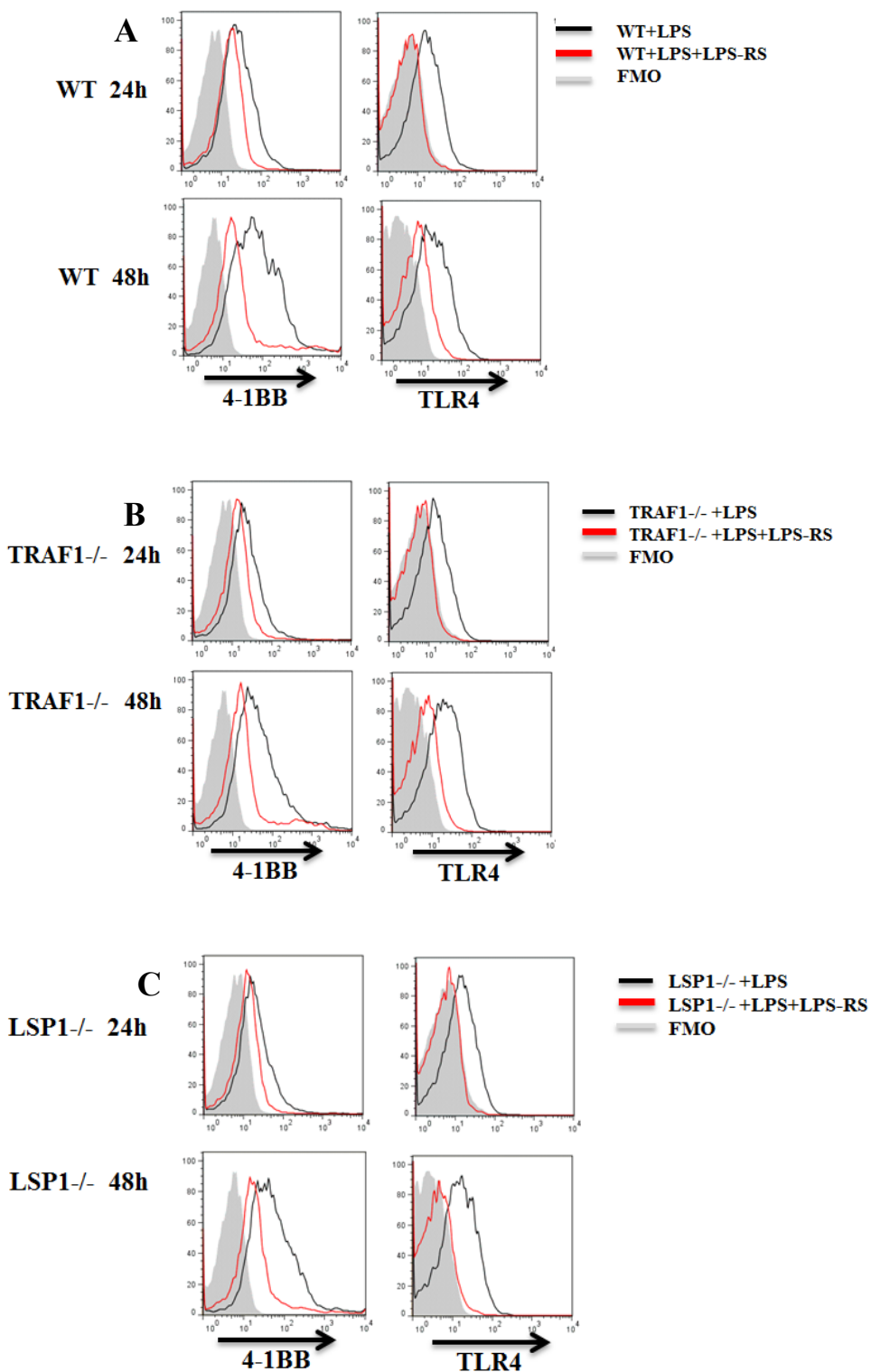


Figure 3. TLR4 dependent induction of 4-1BB expression in murine B cells.

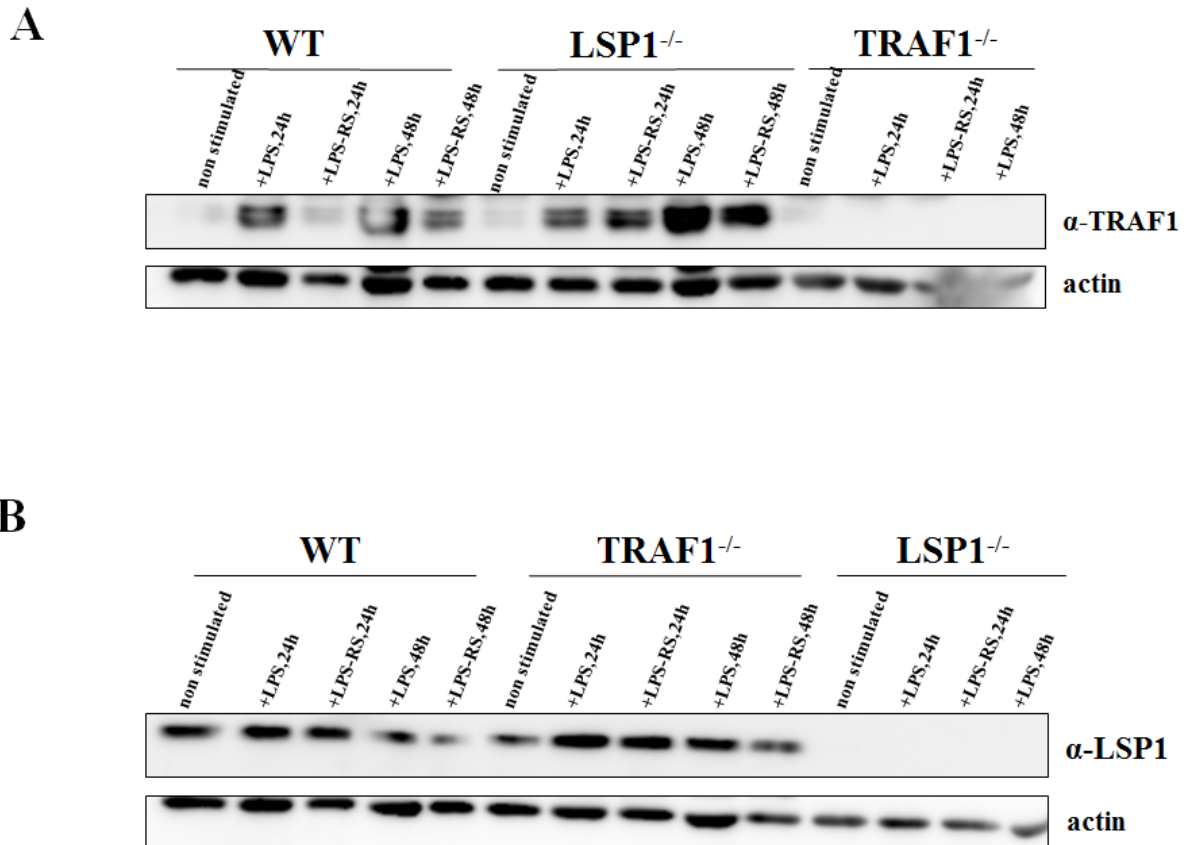


Figure 4. Induction of TRAF1 expression in murine CD19 B cells following LPS stimulation.

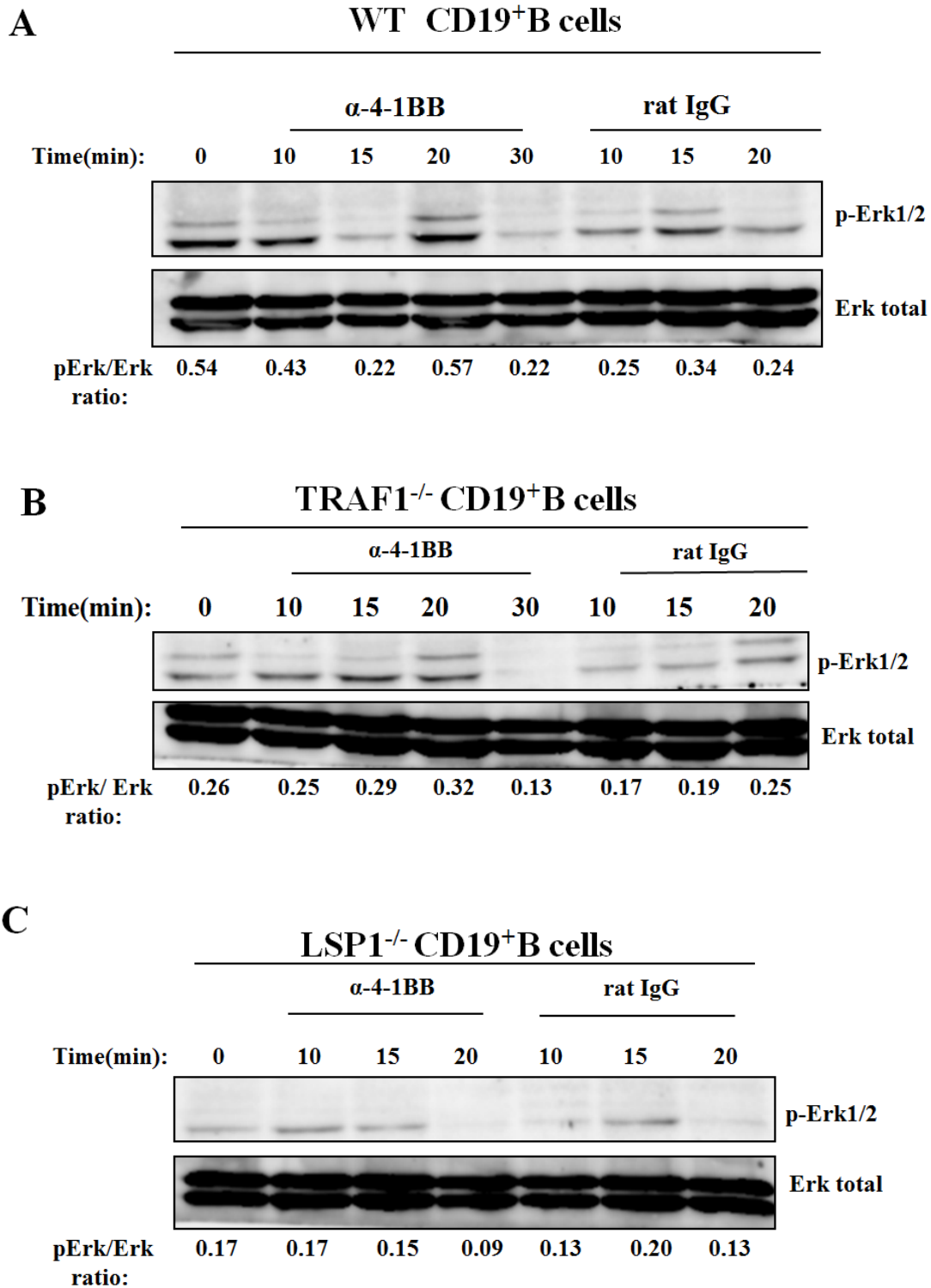


Figure 5. The absence of TRAF1 and LSP1 in murine CD19 B cells leads to defective ERK activation downstream of 4-1BB signaling.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

L'équilibre entre la survie et la mort cellulaire programmée (apoptose) des lymphocytes régule l'homéostasie du système immunitaire et prévient ainsi le développement des maladies auto-immunes, inflammatoires et des tumeurs. L'inhibition de l'apoptose des cellules T pendant la réponse immunitaire est un mécanisme indispensable afin qu'elles puissent exercer leurs activités effectrices. De plus, le **(ce)** mécanisme est nécessaire pour la différenciation des cellules T effectrices en cellules T mémoires.

La survie et la mort des lymphocytes régulées par des paires récepteur/ligand appartenant à la superfamille de TNFRs/TNF-L jouent un rôle clé dans l'issue de la réponse immunitaire. Durant cette réponse, le récepteur 4-1BB(CD137), un médiateur important impliqué dans la réponse immunitaire, est responsable pour l'activation maximale et la survie des cellules T mémoires. L'induction de l'expression de 4-1BB à la surface des cellules T CD8 mémoires contribue à leur survie après l'élimination de l'antigène (*Sabbagh, L., et al, 2006*). Ce rôle a été associé à l'interaction avec son ligand physiologique, 4-1BBL (CD137L). Plusieurs études ont été faites afin de bien comprendre le rôle du récepteur 4-1BB dans la survie des lymphocytes T et B ainsi que le mécanisme moléculaire précis par lequel les niveaux de la molécule pro-apoptotique Bim sont régulés après son engagement favorisant ainsi la survie cellulaire.

Le rôle bénéfique du récepteur 4-1BB dans la survie des lymphocytes est bien documenté dans la littérature. La survie des lymphocytes permettra aux cellules d'exercer ses fonctions effectrices, d'éliminer les cellules infectées afin de garder l'homéostasie dans l'organisme ainsi que de garder une population de cellules mémoires qui vont répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une deuxième invasion du même antigène. Par contre, l'implication du récepteur dans la survie des cellules malignes a un effet néfaste sur l'organisme car il va contribuer à l'amplification des signaux de survie qui pourraient induire des cancers. Il est intéressant de noter que l'activation du couple 4-1BB/4-1BBL s'oppose aux effets des médicaments anticancéreux (doxorubicin et camptothecin), favorisant la prolifération et la survie accrue des cellules leucémiques s'échappant ainsi à l'action de la drogue (*Kim, K.M. et al, 2002*). Il a été démontré aussi que l'administration des médicaments anticancéreux comme la doxorubicin et la bléomycin à des concentrations sous-cytotoxiques mène à l'augmentation

de l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules T activées, dérivées de la leucémie aigüe, et en conséquence à l'amplification des signaux anti-apoptotiques générées par le récepteur 4-1BB (Kim, K.M. et al, 2002). De plus, les mécanismes contrôlant la mort cellulaire seront réprimés par l'activation constitutive des cascades menant à la survie accrue des cellules tumorales. Alors, il est très important de bien connaître les cascades menant à la survie cellulaire, car chaque molécule impliquée dans la survie des cellules malignes représente une cible thérapeutique qui pourrait s'avérer la clé avec laquelle nous pouvons combattre une maladie incurable comme le cancer.

Une étude précédente (Sabbagh, L. et al, 2008), avait démontré dans un modèle murin que le récepteur 4-1BB favorise la survie des cellules T en modulant le niveau de l'expression de la molécule pro-apoptotique Bim d'une manière TRAF1 dépendante. De plus, il a été démontré que TRAF1 est nécessaire pour l'expansion et la survie des cellules T mémoires en présence d'agonistes anti-4-1BB *in vivo* (Sabbagh, L. et al, 2006). Suite à l'activation du récepteur 4-1BB, TRAF1 et ERK sont impliqués dans la phosphorylation de Bim et la modulation de son expression en aval. L'activation et la régulation de TRAF1 et Bim ont un rôle important dans la survie des cellules T CD8 mémoire (Sabbagh, L. et al, 2006). Cependant, le mécanisme précis par lequel TRAF1 exerce son effet anti-apoptotique par l'intermédiaire d'ERK menant à la diminution de niveau de la molécule pro-apoptotique Bim n'est pas encore élucidé.

D'ailleurs, l'expression de TRAF1 est hautement régulée dans les lymphocytes malgré que, dans certaines pathologies, il ait été démontré que la surexpression de cette protéine soit à la base de la survie des cellules cancéreuses (Zapata, J.M. et al, 2000). Une autre étude a aussi démontré que, suite à l'inhibition de l'expression du gène codant la protéine TRAF1 en utilisant du siRNA, une diminution de l'activité de NF- κ B est observée dans la lignée cellulaire K428 (lignée cellulaire dérivée d'un lymphome Hodgkin de cellules B), menant ainsi à l'augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques (Guo, F. et al, 2009) confirmant le rôle important de TRAF1 dans la survie des lymphocytes.

Notre premier objectif dans cette étude était de bien comprendre comment TRAF1 contribue à l'activation de la cascade en aval de 4-1BB favorisant la survie des cellules T CD8⁺ et si TRAF1 est impliqué seul dans la phosphorylation d'ERK ou l'activation se faisait par un intermédiaire. En utilisant l'approche protéomique, nous avons identifié qu'une nouvelle

protéine, Leukocyte Specific Protein 1 (LSP1), s'associe au complexe de signalisation d'une manière TRAF1-dépendante. La liaison entre TRAF1 et LSP1 est spécifique à la partie unique N-terminale de TRAF1 et indépendante de la partie TRAF-C, conservée chez tous les TRAFs (*Sabbagh, L., Andreeva, D. et al, 2013*). Cette spécificité démontre le rôle indispensable de la coopération entre TRAF1 et LSP1 à la survie des lymphocytes T après l'engagement du récepteur 4-1BB. Il faut noter que, l'interaction directe entre TRAF1 et LSP1 représente le premier rapport d'association entre ces deux molécules. Cette association est très importante car cette coopération est impliquée dans l'activation d'ERK dans les cellules T activées. Dans les cellules le niveau de la molécule pro-apoptotique Bim est régulé par la phosphorylation d'ERK. En effet, Bim possède plusieurs sites qui peuvent être phosphorylés par ERK car l'activation d'ERK (sa phosphorylation) mène à la phosphorylation de Bim provoquant ainsi sa dégradation par le protéasome (*Ley R, et al, 2003*). Évidemment, le rôle important de LSP1 est d'assurer la liaison entre TRAF1 et ERK en aval du récepteur 4-1BB dans les lymphocytes T (*Sabbagh, L., Andreeva, D. et al, 2013*).

L'étude antérieure sur le rôle de TRAF1 (*Sabbagh, L. et al, 2008*) a démontré l'incapacité des cellules T murines déficientes en TRAF1 d'activer ERK après une stimulation anti-4-1BB et de diminuer ainsi les niveaux de Bim. Dans l'étude actuelle (*Chapitre 2*), nous avons démontré que l'absence de LSP1 dans les cellules T murines entraîne un défaut similaire dans l'activation d'ERK après une stimulation anti-4-1BB. Ce résultat suggère fortement l'importance de la liaison entre TRAF1 et LSP1 démontrant ainsi que la coopération entre les deux protéines est essentielle pour l'activation d'ERK car la phosphorylation de Bim par ERK inhibe l'effet pro-apoptotique de Bim et améliore la survie des cellules T. L'incapacité des cellules T déficientes en LSP1 d'induire l'activation d'ERK a un effet important sur la survie des lymphocytes T car l'activation de la voie ERK est connue aussi par son effet anti-apoptotique menant à l'inhibition de CD95 (récepteur Fas), un autre membre de la superfamille de TNFRs impliqué dans l'induction de l'apoptose dans les cellules T activées (*Holmstrom TH, et al, 2000*). De plus, sachant que TRAF1 joue un rôle critique dans la survie des cellules T CD8 mémoires et que TRAF1 interagit directement avec LSP1, nous avons vérifié si LSP1 était impliqué dans la survie des cellules T CD8 mémoires. Nous avons généré alors des cellules T CD8 mémoires déficientes en LSP1 par l'introduction de shRNA contre le gène codant pour la protéine LSP1 dans le but d'inhiber l'expression de la protéine et étudier l'effet direct de

cette inhibition (*Figures supplémentaires à l'annexe-Figures 1 à 4*). Ainsi, au jour 8, les cellules T mémoires qui expriment le gène de LSP1 ont montré un taux de survie, de 79%. Par contre, lorsque les cellules T sont déficientes en LSP1, le taux de survie diminue considérablement (39% et 40%) comparé aux cellules contrôles (*Figure 4 à l'Annexe*). Ceci suggère que LSP1 joue un rôle important dans la survie des cellules T CD8 mémoires.

LSP1 est une protéine qui est impliquée dans l'inhibition de la motilité cellulaire (*Li, Y. et al, 2000*). Pour une cascade constitutivement activée, cette inhibition pourrait avoir un effet bénéfique car ça mènerait à la limitation des contacts prolongés entre les cellules malignes limitant ainsi leur survie. Or, la surexpression de LSP1 mène à l'inhibition de la motilité cellulaire (*Cicchetti, G., et al, 2002*) en modifiant l'organisation de l'actine (*Moulding, D. A., et al, 2013*).

Selon une étude, (*Zapata, J.M. et al, 2000*), une analyse faite sur 83 lignées cellulaires tumorales humaines a révélée l'expression de TRAFs particulières dans certains types de cancer. Par exemple, l'expression de TRAF1 était limitée aux leucémies et lymphomes de nature cellules B exprimant constitutivement ce membre de la famille des TRAFs. Une analyse immuno-histochimique de 232 échantillons de patients atteints de lymphome non-Hodgkin a démontré que TRAF1 est surexprimé dans 48% des cas analysés. De plus, un niveau de l'expression très élevée de cette protéine a été observé dans les cellules B circulantes en provenance des patients atteints de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) comparé au PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de donneurs sains. Il est intéressant de noter que les personnes ayant la LLC et dont les cellules expriment les plus hauts niveaux de TRAF1 sont résistantes au traitement, ce qui suggère que les niveaux élevés de TRAF1 donneraient un avantage de survie plus accru aux cellules. D'ailleurs, la surexpression de TRAF1 dans les cellules B tumorales semble être à la base de la survie des cellules cancéreuses (*Zapata, J.M. et al, 2000*).

Dans un rapport analysant les variations génétiques communes dans des gènes ciblés qui sont associés avec l'immunité et l'inflammation ainsi qu'à la prédisposition au développement du lymphome non-Hodgkin (NHL) en analysant les SNPs (single nucléotide polymorphisms), il a été déterminé que TRAF1 est fortement associé avec un risque de développer cette maladie (*Cerhan, J. R. et al, 2007*). De plus, la même étude a démontré que LSP1 est aussi associée avec un risque très élevé de développer le lymphome non-Hodgkin. En effet, toutes les études citées

montrent que les gènes du récepteur 4-1BB, de TRAF1 et de LSP1 pourraient être impliqués dans la survie accrue des lymphocytes malins promouvant ainsi la formation des cellules tumorales s'échappant à la surveillance du système immunitaire et menant à la croissance et la prolifération incontrôlées et en conséquence à des maladies incurables comme la Leucémie Lymphoïde Chronique (CLL).

Afin de tester cette hypothèse, le deuxième objectif important de ce projet était d'étudier la cascade de signalisation après l'engagement du récepteur 4-1BB dans les lymphocytes B afin d'évaluer l'implication du complexe 4-1BB, TRAF1 et LSP1 dans la survie des cellules B saines et malignes. Dans un premier temps, nous avons tout d'abord choisi d'étudier le modèle murin car notre laboratoire disposait des souris de deux génotypes d'intérêt, soient TRAF1^{-/-} et LSP1^{-/-}. Fait intéressant, une seule étude a été faite concernant l'expression du récepteur 4-1BB par les cellules B murines (*Futagawa, T., et al, 2002*) démontrant que les lymphocytes B murins n'expriment pas le récepteur suite à une stimulation via le BCR anti-CD40/anti IgM, mais que cette stimulation mène à l'expression de 4-1BBL, le ligand physiologique du récepteur 4-1BB. Par contre, il a été démontré dans le modèle humain, que le récepteur est exprimé à la surface des lymphocytes B humains suite à une stimulation anti-CD40/anti-Ig et que cette expression favorise la prolifération et la survie des lymphocytes B (*Zhang X., et al, 2010*).

Tout d'abord, nous avons confirmé que les cellules B murines n'expriment pas le récepteur 4-1BB après une stimulation via le BCR anti-CD40 ou anti-CD40/anti-IgM. Nos résultats ont démontré aussi que la stimulation via CD40 seul n'amène pas à l'expression de 4-1BBL, mais l'ajout d'anti-IgM mène à une forte induction du ligand physiologique de récepteur 4-1BB, 4-1BBL. En fait, les interactions CD40/CD40L sont responsables de l'expression de 4-1BBL, mais non du récepteur 4-1BB dans les lymphocytes B murines et l'ajout d'anti-IgM améliore encore l'expression de 4-1BBL. Puisque la stimulation via CD40 ne mène pas à l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines, nous avons voulu savoir si un autre récepteur régule l'expression de 4-1BB. Évidemment, à la surface des cellules B il y a d'autres récepteurs, comme les récepteurs de la famille TLRs. Une stimulation avec LPS (Lypopolysaccharide) a révélé que l'expression du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines est régulée par un récepteur du système immunitaire inné, le TLR4. Il est important de noter que c'est le premier rapport montrant l'expression du récepteur 4-1BB par les cellules B murines.

Puis, les études plus poussées ont démontré que cette induction est TLR4 dépendante, car l'addition d'un inhibiteur compétitif de TLR4, le LPS-RS a effectivement diminué l'expression de 4-1BB à la surface des lymphocytes B murins.

Nous avons démontré dans les cellules T murines, que la déficience en TRAF1 ou LSP1 n'influence pas l'expression du récepteur 4-1BB après une stimulation via le TCR (anti-CD3/anti CD28) (*Sabbagh, L., Andreeva, D. et al, 2013*). À la différence des cellules T, les cellules B murines déficientes en TRAF1 ou en LSP1 montrent une réduction de l'expression de 4-1BB à la surface cellulaire comparée aux cellules B en provenance d'une souris WT. Alors, cette réduction dans l'expression de 4-1BB sur les cellules B murines montre que les deux protéines (TRAF1 et LSP1) sont requises pour une expression maximale du récepteur. Nos résultats montrent aussi qu'une stimulation avec LPS mène à l'induction de TRAF1 dans les cellules B murines.

Comme il a été mentionné précédemment, dans les cellules T murines, la déficience en TRAF1 ou LSP1 résulte en une activation défectueuse d'ERK menant à l'augmentation de niveau de Bim (*Sabbagh, L., Andreeva, D. et al, 2013*). Nos résultats d'expériences faites avec les cellules B murines démontrent, de façon similaire, que les cellules B murines déficientes en TRAF1 ou LSP1 ne sont pas capables d'activer ERK après une stimulation anti-4-1BB. Nous pouvons affirmer qu'il y a de la ressemblance entre les cellules murines T et B déficientes en TRAF1 et LSP1 dans leur capacité d'activer la map kinase ERK après l'engagement du récepteur 4-1BB, quoi que l'activation des cellules se fasse via TCR pour les cellules T et via TLR4 pour les cellules B murines.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au comportement des cellules B dans le modèle humain après l'induction du récepteur 4-1BB à la surface cellulaire. Tout d'abord, nous avons confirmé (*Figure 5 à l'annexe*) que les cellules B en provenance d'un donneur sain expriment le récepteur 4-1BB suite à une stimulation anti-CD40/anti-Ig comme il est montré par *Zhang X., et al, (2010)*. Malheureusement, même après plusieurs reprises ainsi qu'une variation de la concentration des anticorps utilisés nous n'avons pas pu observer qu'une stimulation avec anticorps anti-hCD40 (monoclonal ou polyclonal) seul ou en combinaison avec anti-hIg(A+G+M) mène à l'induction du récepteur 4-1BB à la surface des lymphocytes B humaines comme il a été montré dans l'étude faite par (*Zhang X., et al, 2010*). Par contre, nous avons confirmé la participation de l'interaction CD40/CD40L dans l'induction du récepteur 4-

1BB à la surface des lymphocytes B humains en utilisant les fibroblastes murins (3T3-CD40L) exprimant le CD40L(CD154) membranaire (*Figure 5B à l'annexe*). Ces résultats suggèrent qu'il y a potentiellement un autre récepteur ou ligand à la surface des cellules 3T3 qui coopère avec le signal de CD40-CD40L pour induire l'expression de 4-1BB. De plus, nous avons vérifié (*Figure 5B à l'annexe*) l'induction de 4-1BB dans les cellules B humaines par d'autres stimuli comme le LPS et l'anticorps anti-hIg (A+G+M) seul afin de les comparer aux cellules B murines. Nos résultats ont démontré que le récepteur est faiblement induit dans les cellules B humaines suite une stimulation anti-hIg(A+G+M), mais que la stimulation via CD40 (par CD40L membranaire en provenance des fibroblastes murins) a été le seul stimulus menant à une forte l'induction de 4-1BB à la surface cellulaire des cellules B humaines en provenance de donneurs sains. L'analyse par cytométrie en flux a permis de constater que contrairement aux cellules B murines, une stimulation avec LPS n'amène pas à l'induction du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B humaines (*Figure 5B à l'annexe*) ce qui représente une différence majeur entre les cellules B murines et humaines concernant l'induction de l'expression du récepteur 4-1BB.

Nos résultats dans le modèle murin ont démontré que le LPS induit une forte expression de TRAF1 alors, nous voulions savoir si une stimulation avec le LPS mènerait à l'induction de TRAF1 dans les cellules B humaines en provenance des donneurs sains. Ainsi, une stimulation avec LPS ou anti-IgM a induit très faiblement TRAF1 dans les cellules B humaines, alors qu'une stimulation anti-CD40/anti-Ig(A+G+M) mène à une forte induction de TRAF1 (*Figure 6 à l'annexe*). Ce résultat représente une autre différence majeure entre les cellules B humaines et murines.

Selon la littérature, le récepteur CD40 est capable de recruter par sa queue cytoplasmique directement ou indirectement TRAF1, 2, 3,5 et 6 (*Pullen, S.S., et al, 1998*). Nos résultats montrent que l'anticorps anti-hCD40 (monoclonal ou polyclonal) n'est pas capable d'induire l'expression maximale de TRAF1 dans les cellules B humaines. En effet, la stimulation avec l'anticorps anti-CD40 est nécessaire, mais n'est pas suffisante pour induire l'expression de TRAF1 dans les cellules B humaines. Un autre signal en provenance de Ig est requis afin d'induire une activation complète de cellules B menant ainsi à l'induction de l'expression TRAF1 (*Figure 6 à l'annexe*).

Il est intéressant de noter que dans les cellules B humaines, la même stimulation (anti-hCD40/anti-hIg) mène à l'expression du récepteur 4-1BB à la surface cellulaire et à l'induction de TRAF1. Alors, une fois les cellules B humaines stimulées via CD40, elles expriment le récepteur 4-1BB à la surface cellulaire menant à l'induction de l'expression de TRAF1 et à son recrutement par 4-1BB. Le niveau de l'expression de la protéine LSP1 dans les cellules B humaines non stimulées est plus élevé comparé aux cellules stimulées (*Figure 6B à l'annexe*). Alors, des études plus poussées sont nécessaires afin de bien étudier tous les éléments de la cascade après l'engagement du 4-1BB dans les cellules B humaines. Il est important de bien comprendre si la cascade démontrée dans les cellules T et B murines est applicable pour les cellules B humaines et si cette cascade est impliquée dans la survie de cellules B humaines. D'ailleurs, une étude faite récemment démontre que le récepteur 4-1BB est induit via le récepteur CD40 dans les cellules B en provenance de patients atteints de la LLC et que son activation favorise la survie des cellules tumorales en les protégeant de l'apoptose spontanée (*Nakaima, Y. et al, 2013*).

Finalement, grâce à une collaboration avec le Dr. Éric Milot et Dr. Denis-Claude Roy du Centre de recherche-HMR, nous avons disposé des cellules B des donneurs sains ainsi que de lysats cellulaires en provenance des patients atteints de la Leucémie Lymphoïde Chronique, ce qui nous a permis d'évaluer et comparer le niveau d'expression de deux partenaires d'intérêt : TRAF1 et LSP1 (*Figure 7 à l'annexe*). Les résultats ont permis de constater que la majorité des lysats cellulaires de patients montrent une surexpression de la protéine LSP1 d'un niveau surprenant comparé au donneur sain (*Figure 7 à l'annexe*). De plus, nous pouvons détecter facilement le plus haut niveau d'expression de TRAF1 dans deux échantillons (les patient #2 et #6) pour lesquels la maladie a progressé et dont les patients devaient être traités à plusieurs reprises (Fludarabine, cyclophosphamide et rituximab) (*Figure 7 à l'annexe*). Il serait intéressant de savoir si les deux patients vont répondre aux traitements car, dans la littérature, il est montré que les patients avec une surexpression de TRAF1 répondent mal aux traitements. Ainsi, il semble que les niveaux élevés de TRAF1 donneraient un avantage de survie plus accrue aux cellules. Évidemment, ces résultats doivent être reconfirmés avec un plus grand nombre d'échantillons. Il serait intéressant d'étudier aussi si les deux protéines d'intérêt liées d'une manière directe dans une cascade peuvent s'avérer des biomarqueurs nous indiquant le stade de la maladie (Leucémie Lymphoïde Chronique) et le besoin d'un traitement. Des études plus

approfondies sont nécessaire afin de bien comprendre l'implication du récepteur 4-1BB, TRAF1 et LSP1 dans la survie des cellules B saines et malignes. De plus, une inhibition de TRAF1 ou LSP1 ou les deux ensembles, en utilisant les shRNA contre ces deux protéines peut être envisagé dans les cellules leucémiques dans le but de comprendre si l'inhibition serait capable de bloquer une cascade qui semble constitutivement activée. Afin d'élucider les mécanismes de survie des cellules leucémiques, il est primordial de choisir le bon modèle car nos résultats ont démontré une différence majeure entre les cellules B humaines et murines, ce qui concerne les signaux menant à l'induction d'un récepteur important impliqué dans la survie cellulaire comme 4-1BB.

Les travaux faits dans le cadre de ce mémoire ont permis d'ajouter un autre morceau dans le puzzle concernant une cascade importante comme la voie de signalisation en aval du récepteur 4-1BB, démontrant la coopération importante entre deux partenaires TRAF1 et LSP1 impliquée dans la survie cellulaire. De plus, la découverte de l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B murines pourrait nous permettre d'effectuer des études précliniques plus approfondies concernant l'implication de la cascade en aval de 4-1BB dans la survie des cellules B malignes.

4.2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons montré qu'une nouvelle protéine, LSP1, se lie à la cascade de signalisation 4-1BB dans les lymphocytes T et que le rôle important de LSP1 est d'assurer la liaison entre TRAF1 et ERK. Il a été démontré aussi que LSP1 lie la partie unique de TRAF1 d'une manière directe indépendamment de la partie conservée chez autres TRAFs. L'association directe entre les deux protéines s'avère très importante car l'activation d'ERK provoque la dégradation de la molécule pro-apoptotique Bim après l'engagement du récepteur 4-1BB favorisant ainsi la survie des cellules T. Dans cette étude, il a été montré aussi que la déficience en LSP1 dans les cellules T activées provoque une activation défectueuse d'ERK menant à

l'accumulation de Bim. Par contre, la déficience en LSP1 n'affecte pas l'expression du 4-1BB à la surface cellulaire, car les cellules T WT, TRAF1^{-/-} et LSP1^{-/-} expriment de façon uniforme le récepteur après une stimulation α -CD3/ α -CD28.

La suite des études dans les cellules B murines représente un premier rapport dans lequel a été identifié le signal menant à l'induction du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines. Nous avons démontré que l'expression du récepteur 4-1BB est induite suite à une stimulation au LPS et est régulée par un récepteur du système immunitaire inné, le TLR4. Contrairement aux lymphocytes T, les deux génotypes étudiés, soient TRAF1^{-/-} ou LSP1^{-/-}, affectent le niveau de l'expression du récepteur à la surface des lymphocytes B murines, ce qui suggère que les deux sont requises pour une activation maximale des cellules B. De façon similaire aux cellules T, la déficience des deux protéines d'intérêt dans les cellules B affecte aussi l'activation d'ERK. Par contre, cette étude n'a pas démontré le rôle de l'activation de la cascade 4-1BB dans la survie de lymphocytes B murins, car dans les premiers 48h après l'activation de la cascade, nous n'avons pas pu observer une différence dans la survie pour les deux génotypes étudiés. De plus, il serait intéressant d'évaluer le niveau de Bim après l'activation de la cascade pour montrer la participation de TRAF1 et LSP1 dans la régulation de niveau de Bim et l'amélioration de la survie des lymphocytes B. Il sera donc intéressant d'étudier l'effet de la coexistence de 4-1BB et 4-1BBL à la surface de la même cellule sur la réponse biologique des cellules B, car cette coexistence peut avoir les effets physiologiques ou physiopathologiques.

Contrairement à leur rôle bénéfique durant la réponse immunitaire, les mécanismes de survie cellulaire contribuent à la sévérité de plusieurs maladies notamment le cancer. La survie des lymphocytes B, ainsi que leur résistance à l'apoptose induite par l'activation des voies anti-apoptotiques, augmentent l'accumulation et la persistance de ces cellules dans le sang. De plus, plusieurs études ont associé la sévérité (l'avancement de la maladie) à la surexpression de certaines protéines comme 4-1BB, TRAF1 et LSP1. Ceci suggère que l'accumulation et la survie des cellules B peuvent être contrôlées par l'effet du couple 4-1BB/4-1BBL et les molécules activées en aval.

Les résultats de nos études faites dans les cellules B ainsi que les données dans la littérature nous poussent à réfléchir sur certaines questions. À quoi sert l'expression du récepteur et de son ligand à la surface de la même cellule? Normalement, un type de cellule exprime soit le récepteur, soit son ligand. Pourquoi la cellule B exprimera-t-elle les deux? Un

signal donné va mener à l'expression du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B. Un autre signal mènera à l'expression du ligand physiologique du récepteur 4-1BB, 4-1BBL à la surface toujours des cellules B. Quel l'effet aurait-il sur les cellules en question si les deux signaux sont présents en même temps? Une autostimulation est-elle possible et mènerai-t-elle à une pathologie et le développement de tumeurs ou à la régulation de l'homéostasie lorsque d'autres signaux de la survie sont insuffisants? Aurons-nous une accumulation des cellules B ou un épuisement des cellules T à cause d'une compétition avec les cellules B pour 4-1BBL? Il serait donc intéressant de vérifier le modèle que nous proposons afin de pouvoir bien comprendre le comportement des cellules B exprimant un couple récepteur/ligand impliqué dans la survie cellulaire. Pour cela, les études plus approfondies peuvent être effectuées dans le modèle murin afin de nous permettre de vérifier l'issue des interactions probables entre les cellules B murines exprimant 4-1BB après une stimulation avec LPS et les cellules B murines exprimant 4-1BBL suite à une stimulation α -CD40/ α -IgM. Une telle étude nous permettra d'évaluer l'impact des interactions entre les cellules B exprimant 4-1BB et les cellules B exprimant 4-1BBL car le couple 4-1BB/4-1BBL est bien connu pour favoriser la prolifération et la survie cellulaire. Il est possible que l'activation du 4-1BB/4-1BBL dans les cellules B résultera en une compétition pour 4-1BBL entre les cellules T cytotoxiques spécifiques exprimant 4-1BB et les cellules B exprimant 4-1BB ce qui pourrait mener à l'inactivation des cellules T et, en conséquence, à l'accumulation des cellules B à cause d'un défaut dans l'apoptose ou l'incapacité de cellules T d'exercer ses activités cytotoxiques. La même étude peut être effectuée avec les cellules B humaines afin de comparer les deux modèles.

Enfin, cette étude nous a permis de comprendre qu'il existe une différence majeure concernant les signaux menant à l'induction du récepteur 4-1BB dans les cellules B murines et humaines. L'expression du récepteur 4-1BB et de TRAF1 est régulée par le CD40 et l'Ig dans le modèle humain et par le récepteur TLR4 dans le modèle murin. Il serait intéressant aussi de connaître les résidus du TRAF1 ou LPS1 impliqués dans l'interaction directe entre ces deux protéines menant à l'activation d'ERK et menant à la survie cellulaire. Une fois identifiées, des formes mutées au niveau de TRAF1 ou LSP1 impliquées dans ces interactions peuvent être générées qui peuvent par la suite nous servir à vérifier la contribution de deux protéines dans la réponse immunitaire et dans le développement des cellules B malignes. En se basant sur les caractéristiques anti-apoptotiques des voies de signalisations induites par le 4-1BBL *via* 4-1BB,

l'interaction directe de TRAF1 avec LSP1 pourrait constituer une nouvelle cible contribuant à la survie des lymphocytes B leucémiques. D'autres études seront nécessaires afin de montrer le rôle de l'activation de la cascade de 4-1BB pour une meilleure compréhension de la contribution de cette cascade dans l'homéostasie du système immunitaire ainsi que dans le développement des maladies incurable comme la LLC.

ANNEXE

I. Génération des cellules T mémoires de souris déficientes en LSP1

RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen est un vecteur rétroviral qui possède la capacité de s'auto-inactiver. Il est créé de manière à exprimer un ARNsh (small hairpin RNA) via le promoteur humain U6 (P_{U6} : RNA Pol III-dependent) ce qui va mener à la production de siRNA capable de se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messenger et ainsi d'empêcher l'expression du gène cible. Une autre caractéristique de ce vecteur est la capacité d'exprimer de façon constitutive le gène codant la protéine ZsGreen (*Zoanthus* sp. green fluorescent protein) (Clontech).

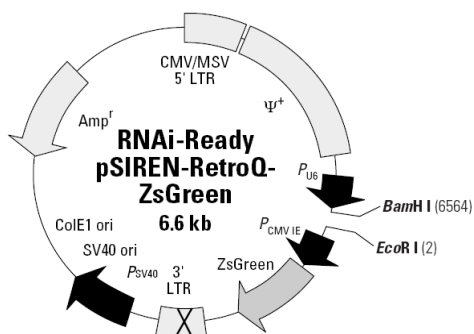


Figure 1. La représentation du vecteur rétroviral RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen. Deux shRNA différents qui ciblent LSP1 ont été utilisés pour le clonage via le vecteur RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen :

shRNA1

5'-gattccGAGTCAGTCTGCTCTCTAAGTTCAAGAGACTTAGAAGCAGACTGACTCTTTTTACGCGTg—3'
5'-aattcACGCGTAAAAAAGAGTCAGTCTGCTCTAAGTCTCTTGAAGCTAGAAGCAGACTGACTCg—3'

shRNA3

5'-gattccGCAGACACTCATCAGCCTGATTCAAGAGATCAGGCTGATGAGTGTCTGTTTTACGCGTg—3'
5'-aattcACGCGTAAAAAACAGACACTCATCAGCCTGATCTCTTGAATCAGGCTGATGAGTGTCTGcg—3'

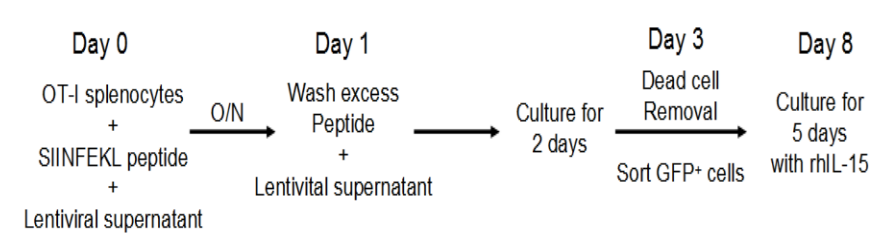


Figure 2. Schéma générale montrant les étapes de génération des cellules T CD8 mémoires déficientes en LSP1. Les splénocytes totaux en provenance de la rate de souris TCR transgéniques OT-I ont été purifiés après la lyse des globules rouges en utilisant le chlorure d'ammonium-potassium-tampon de lyse (ACK). Les cellules ont été mis en culture (5×10^6 cellules) dans le milieu de culture RPMI complète (RPMI 1640 avec L-glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) complété avec 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% pénicilline (10000 unités/mL), 1% streptomycine (10000 ug/mL), 0.1% β -2-mercaptoethanol, 1% acides aminées non essentielles (NEAA 100X), 1% sodium pyruvate (200mM), et 1% HEPES (1M)). Puis, les splénocytes OT-I ont été soumis à une stimulation avec le peptide SIINFEKL (d'ovalbumine, fourni par Dr. N. Labrecque) ($0.1 \mu\text{g/mL}$) pour 18h dans une plaque à 6 puits à $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Aux jours 0 et 1, les cellules ont été incubées (centrifugation 2250 rpm, 90min, 25°C) en présence du surnageant lentiviral permettant l'inhibition du gène codant la protéine LSP1. Au jour 3, les cellules T CD8⁺ vivantes ZsGreen⁺ ont été triées au FACS Aria de la culture et les cellules vivantes ont été mises en présence d'IL-15 (rhIL-15) recombinant humain (20ng/ml) pendant 5 jours.

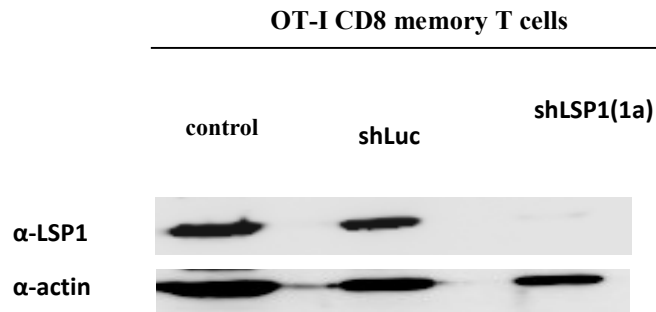


Figure 3. Analyse des cellules T CD8 mémoires, control LSP1 et LSP1 déficientes par Western blot. Les splénocytes totaux en provenance de la rate de souris TCR transgéniques OT-I ont été purifiés après la lyse des globules rouges en utilisant le chlorure d'ammonium-potassium-tampon de lyse (ACK). Les cellules ont été mis en culture (5×10^6 cellules) dans le milieu de culture RPMI complète (RPMI 1640 avec L-glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) complété avec 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% penicillin (10000 unités/mL), 1% streptomycin (10000 ug/mL), 0.1% β -2-mercaptoethanol, 1% acides aminées non essentielles (NEAA 100X) , 1% sodium pyruvate (200mM), et 1% Hepes (1M)). Puis, les splénocytes OT-I ont été soumis à une stimulation avec le peptide SIINFEKL (d'ovalbumine, fourni par Dr. N. Labrecque) ($0.1 \mu\text{g/mL}$) pour 18h dans une plaque à 6 puits à $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Aux jours 0 et 1, les cellules ont été incubées (centrifugation 2250 rpm, 90min, 25°C) en présence du surnageant lentiviral permettant l'inhibition du gène codant la protéine LSP1. Au jour 3, les cellules T CD8⁺ vivantes ZsGreen⁺ ont été triées au FACS Aria de la culture et les cellules vivantes ont été mises en présence d'IL-15 (rhIL-15) recombinant humain (20ng/ml) pendant 5 jours.

La viabilité des cellules T ZsGreen⁺ a été vérifiée par la Cytométrie en flux. Puis, les protéines de l'échantillon ont été dénaturées par l'addition d'un tampon de charge (SDS reducing buffer contenant 0,5% Tris-HCl pH6, 8, glycérol, 10%(p/v) SDS, 0,5%(p/v) bleu de bromophenol et β -mercaptoethanol) et par chauffage à $90\text{-}100^\circ\text{C}$ pendant 5 minutes. Après la migration sur un gel électrophorèse SDS-PAGE (1h, à 120V), les protéines migrées sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluorure). Le transfert a été effectué pendant 1h sous intensité constante de 20V. Puis, la membrane est incubée dans une solution de TBS-Tween 20 contenant 5% de lait écrémé pendant 1h à la température ambiante sous agitation. La membrane ensuite a été incubée pendant la nuit sous agitation à 4°C avec anticorps primaire α -LSP1 (dilué au 1/1000) dans de TBS-Tween 20 et 0.5% de lait écrémé. Par la suite, après trois lavages successives (5 minutes chacun) dans du TBS-Tween 20 0.05%, la membrane a été incubée pendant 1 heure en présence d'anticorps secondaires conjugué à la HRP (Horseradish Peroxydase, 1/10 000) dans du TBS-Tween20 supplémenté de 0.5% de lait écrémé. La membrane est lavée (3x5min.) dans du TBS-Tween20 et l'activité peroxydase est révélée en utilisant le système Amersham ECL de détection (GE Healthcare Life Sciences) et l'imageur ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences) par la réaction de chimiluminescence.

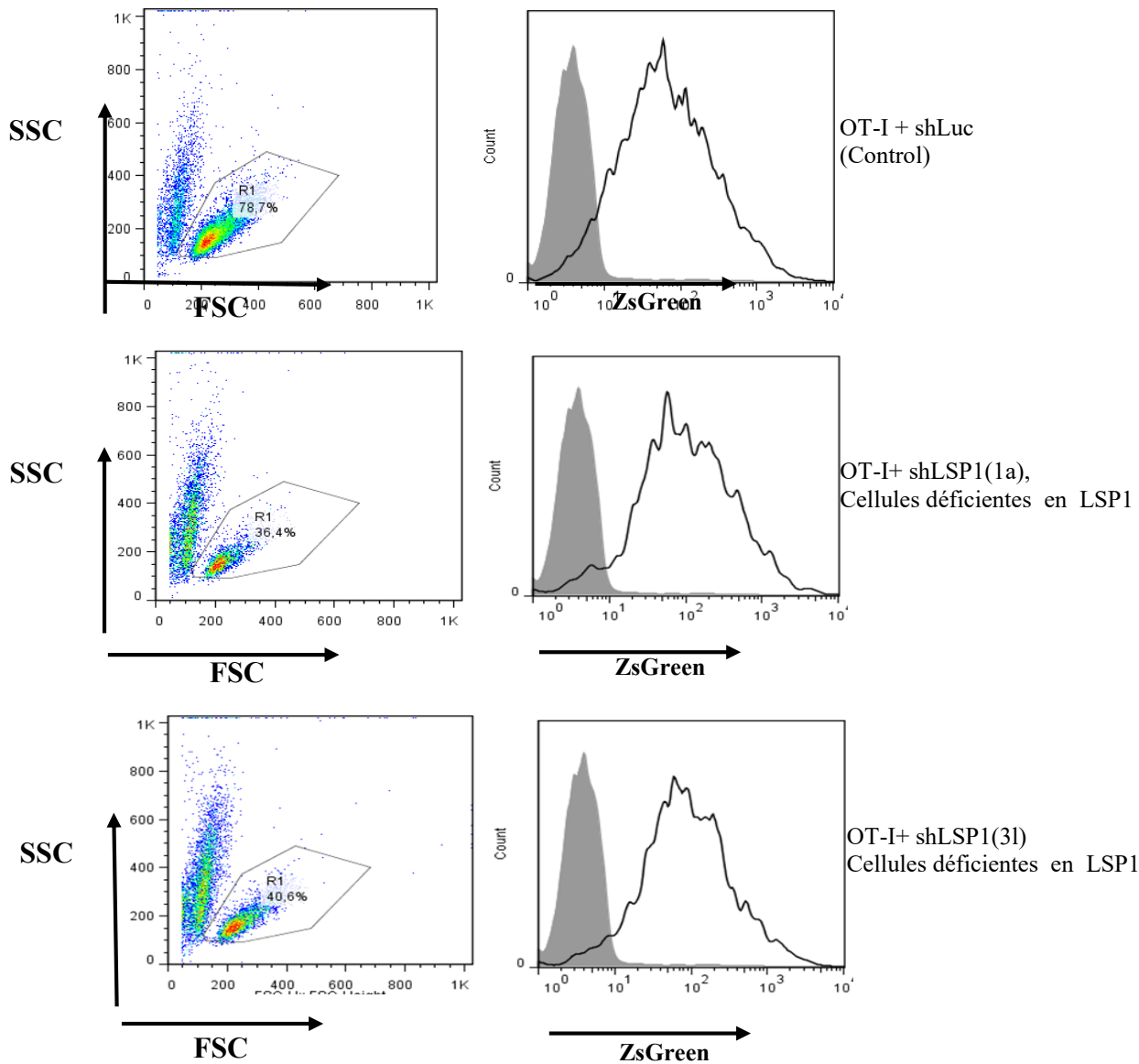


Figure 4. Les graphiques FACS représentant le pourcentage des cellules T CD8 mémoires ZsGreen⁺ vivantes. Les splénocytes totaux en provenance de la rate de souris TCR transgéniques OT-I ont été purifiés après la lyse des globules rouges en utilisant le chlorure d'ammonium-potassium-tampon de lyse (ACK). Les cellules ont été mis en culture (5×10^6 cellules) dans le milieu de culture RPMI complète (RPMI 1640 avec L-glutamine (Life Technologies, Ontario, Canada) complété avec 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% penicillin (10000 unités/mL), 1% streptomycin (10000 ug/mL), 0.1% β -2-mercaptoethanol, 1% acides aminées non essentielles (NEAA 100X), 1% sodium pyruvate (200mM), et 1% Hepes (1M)). Puis, les splénocytes OT-I ont été soumis à une stimulation avec le peptide SIINFEKL (d'ovalbumine, fourni par Dr. N. Labrecque) (0.1 μ g/mL) pour 18h dans une plaque à 6 puits à 37°C/5% CO₂. Aux jours 0 et 1, les cellules ont été incubées (centrifugation 2250 rpm, 90min, 25°C) en présence du surrnaquant lentiviral permettant l'inhibition du gène codant la protéine LSP1. Au jour 3, les cellules T CD8⁺ vivantes ZsGreen⁺ ont été triées au FACS Aria de la culture et les cellules vivantes ont été mises en présence d'IL-15 (rhIL-15) recombinant humain (20ng/ml) pendant 5 jours. La viabilité des cellules T ZsGreen⁺ a été vérifiée par la Cytométrie en flux (Représentatif de 2 expériences).

II. Induction du récepteur 4-1BB à la surface des cellules B humaines en provenance d'un donneur sain. Induction de l'expression de TRAF1 et LSP1 dans les cellules B humaines saines.

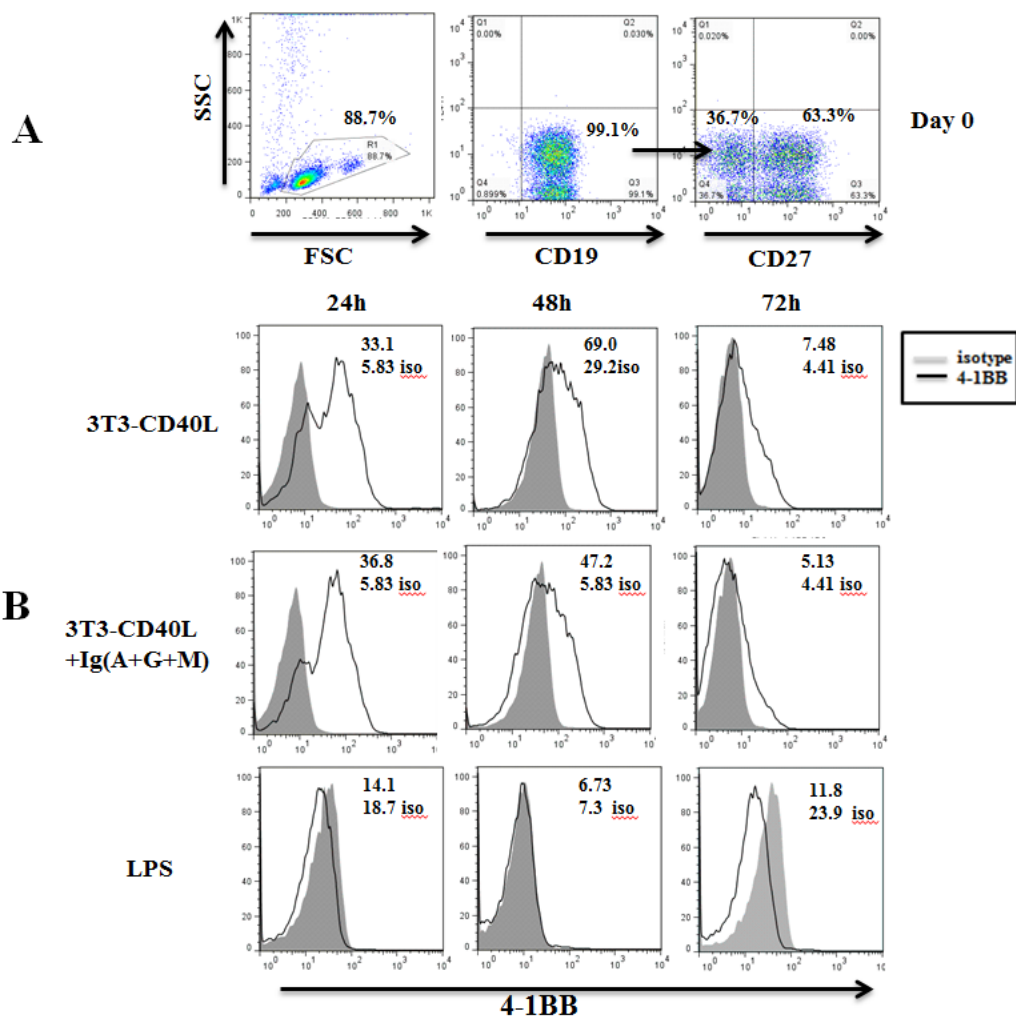


Figure 5. 4-1BB (CD137) is induced by the CD40 signal on human CD19⁺ B cells. B cells from healthy donor were isolated by negative depletion using magnetic bead separation and purity was >90%. For B cell purification, Human B Cell Isolation Kit separation (EasySep; Stem cell Technologies, British Columbia, Canada) was used. Purified CD19⁺ B cells were stimulated with anti-hCD40, 1µg/ml (HumanCD40/TNFRSF5 Antibody, clone 5C3, eBioscience) or Human CD40/TNFRSF5 Antibody polyclonal, R&D ; in the absence or presence of anti-hIg(A+G+M)(AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA+IgG+IgM (H+L);(Jackson Immuno Research; 10µg/ml); or with NIH 3T3-CD40L in the absence or presence of anti-hlg (A+G+M) or LPS from *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich; 1µg/ml). Analysis of B cell cell surface markers expression was performed by flow cytometry as described below. Human B cells were surface-stained with PE labeled anti-hCD19 antibody (BD Bioscience); allophycocyanin (APC) labeled anti-h4-1BB (BD Bioscience); PE labeled anti-CD27 antibody (Biolegend) (Représentatif de 3 expériences).

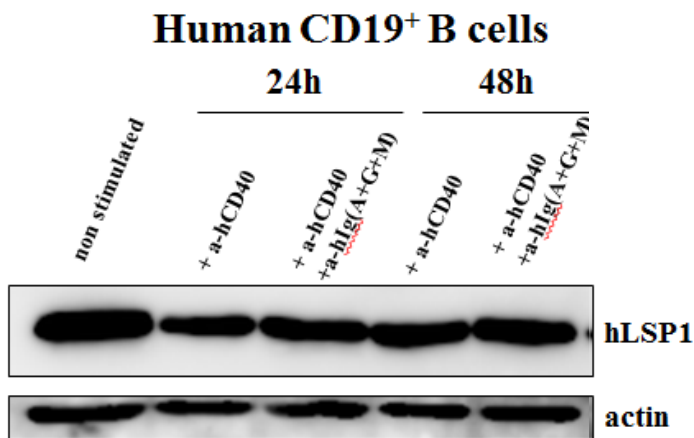
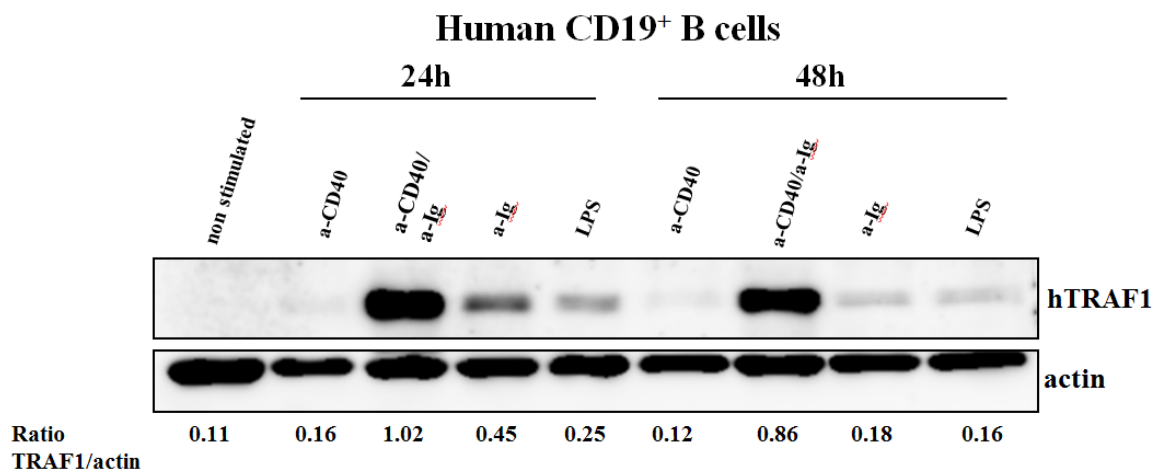
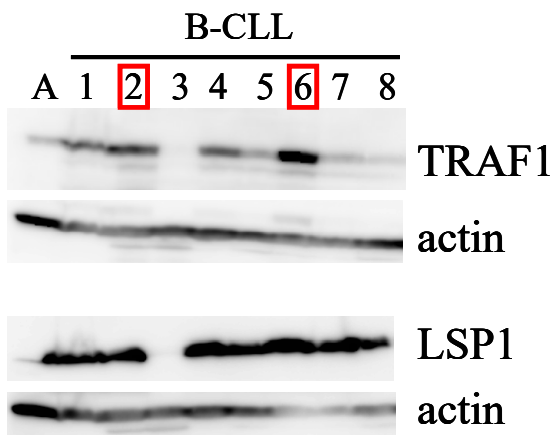


Figure 6. Induction of TRAF1 and LSP1 expression in human CD19⁺ B cells from healthy donor. B cells from healthy donor were isolated by negative depletion using magnetic bead separation and purity was >90%. For B cell purification, Human B Cell Isolation Kit separation (EasySep; Stem cell Technologies, British Columbia, Canada) was used. Purified CD19⁺ B cells were stimulated with anti-hCD40, 1 μg/ml (HumanCD40/TNFRSF5 Antibody, clone 5C3, eBioscience) or Human CD40/TNFRSF5 Antibody polyclonal, R&D); in the absence or presence of anti-hIg(A+G+M)(AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA+IgG+IgM (H+L);(Jackson Immuno Research; 10 μg/ml); or LPS from *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich; 1 μg/ml) for 24h and 48h. Then, the cells were lysed at the indicated time-points, and the levels of human TRAF1, and actin were determined in total lysates by Western blot analysis. Ratios of TRAF1/actin levels in stimulated B cells are shown (Représentatif de 2 expériences).

III. Évaluation des niveaux d'expression de TRAF1 et LSP1 dans les lysats cellulaires en provenance des patients atteints la Leucémie Lymphoïde Chronique.



NO.	D.O.B.*	stage [#]	1st line treatment
1	03/04/1959	B	NO
2	31/12/1937	B	FCRx6*
3	05/12/1932	A	NO
4	04/12/1942	A	NO
5	14/03/1952	A	NO
6	23/01/1947	C	FCRx6*
7	28/05/1927	A	NO
8	13/12/1954	A	NO

Binet staging system.

* D.O.B.: date of birth; FCR: fludarabin, cyclophosphamide, rituximab

Figure 7. Cellules B CD19+ d'un donneur sain vs. cellules B en provenance des patients atteints la Leucémie Lymphoïde Chronique.

A: donneur sain (Laboratoire Dr. Denis Claude Roy, Centre de recherche-HMR), 1-8: B-CLL échantillons Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, France (Laboratoire Dr. Éric Milot, Centre de recherche-HMR). Les protéines de l'échantillon (lysats cellulaires) ont été dénaturées par l'addition d'un tampon de charge (SDS reducing buffer contenant 0,5% Tris-HCl pH6, 8, glycérol, 10%(p/v) SDS, 0,5%(p/v) bleu de bromophenol et β -mercaptoethanol) et par chauffage à 90-100°C pendant 5 minutes. Après la migration sur un gel électrophorèse SDS-PAGE (1h, à 120V), les protéines migrées sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). Le transfert a été effectué pendant 1h sous intensité constante de 20V. Puis, la membrane est incubée dans une solution de TBS-Tween 20 contenant 5% de lait écrémé pendant 1h à la température ambiante sous agitation. La membrane ensuite a été incubée pendant la nuit sous agitation à 4°C avec anticorps primaire α -hLSP1 ou α -hTRAF1 dans de TBS-Tween 20 et 0.5% de lait écrémé. Par la suite, après trois lavages successives (5 minutes chacun) dans du TBS-Tween 20 0.05%, la membrane a été incubée pendant 1 heure en présence d'anticorps secondaires conjugué à la HRP (Horseradish Peroxydase dans du TBS-Tween20 supplémenté de 0.5% de lait écrémé. La membrane est lavée (3x5min.) dans du TBS-Tween20 et l'activité peroxydase est révélée en utilisant le système Amersham ECL de détection (GE Healthcare Life Sciences) et l'imageur ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences) par la réaction de chimiluminescence (Représentatif d'une expérience).

RÉFÉRENCES

- Abbas, A.K.**, Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2007) Cellular and molecular immunology, 6th edition (Philadelphia: Saunders Elsevier).
- Aggarwal, B. B.** (2003) Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756.
- Andrews, D.M.**, Estcourt, M.J., Andoniou, C.E., Wikstrom, M.E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G.R., Van der Most, R.G., Scalzo, A.A., Smyth, M.J, Degli-Esposti, M.A, (2010) Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection, *J Exp Med.* Jun 7; 207(6):1333-43.
- Ardavin, C.**, Wu, L., Li, C.L. Shortman, K.(1993) Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population, *Nature* 362:761-763.
- Arron, J. R.**, Pewzner-Jung, Y., Walsh, M. C., Kobayashi, T., Choi, Y.(2002) Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J. Exp. Med.* 196, 923–934.
- Baessler, T.**, Charton, J.E., Schmiedel, B.J., Grünebach, F., Krusch, M., Wacker, A., Rammensee, H.G. and Salih, H.R., (2010) CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells, *Blood*, 115: 3058-3069.
- Baldrige, M.T.**, King, K. Y., and Goodell, M.A. (2011) Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells, *Trends Immunol*; 32(2): 57–65.
- Barrio, L.**, Saez de Guinoa, J., and Carrasco, Y. R., (2013) TLR4 signaling shapes B cell dynamics via MyD88-dependant pathways and Rac GTPases, *The journal of Immunology*, 191(7):3867-75.
- Batista, F.D.**, Harwood, N.E. (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells, *Nature Reviews Immunology* 9, 15-27.
- Berger, C.T.** et Recher, M. (2015) Immuno-régulation par les lymphocytes T régulateurs, *Forum Médical Suisse*, 15(4) :76-81.
- Bertram E. M.**, Lau, P., Watts T. H. (2002) Temporal segregation of CD28 versus 4-1BBL-mediated costimulation: 4-1BBL influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the memory response following influenza infection. *J. Immunol*, 168, 3777–3785.
- Bertram E. M.**, Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., Watts, T. H.(2004) A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza *in vivo*, *J. Immunol.* 172, 981–988.
- Bouvier, M.** (2003) Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective, *Mol Immunol.* ; 39(12):697-706.
- Bouvier, M.**, Wiley, DC. (1994) Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules, *Science.* 265(5170):398-402.

Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., Mantovani, A. (2003) The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells, *Blood*; 102:956-963.

Bradley, J.R. and Pober, J.S., (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs), *Oncogene*; 20: 6482-6491.

Cannons, J.L., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M.A., Yagita, H., Okumura, K., Watts, T.H, (2001) 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy, *J Immunol.* Aug 1; 167(3):1313-24.

Cao, M.Y., Shinjo, F., Heinrichs, S., Soh, J.W., Jongstra-Bilen, J., and Jongstra, J. (2001) Inhibition of anti-IgM-induced translocation of protein kinase C beta I inhibits ERK2 activation and increases apoptosis, *J Biol Chem.* 2001; 6; 276(27):24506-10.

Caprentier, I., Beyaert, R., (1999) TRAF1 is a TNF-inducible regulator of NF- κ B activation, *FEBS Lett.*; 460: 246-250.

Casali, Xu & Zan Lab, UT Health Science Center at San Antonio, Microbiology and Immunology, Adresse URL: <http://uthscsa.edu/micro-immunology/faculty/pclab/casalilab.asp>

Cerhan J. R., Ansell, S.M., Fredericksen Z.S., Kay, N.E., Liebow, M., Call, T.G., Doganm A., Cunningham, J. M., Wang, A. H., Liu-Mares, W., Macon, W. R., Jelinek, D., Witzig, T. E., Habermann, T. M., Slager, S.L.(2007) Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 110, 4455–4463.

Cicchetti, G., Allen, P.G., Glogauer, M. (2002) Chemotactic Signaling Pathways in Neutrophils: from Receptor to Actin Assembly, *CROBM*, vol. 13 no. 3; 220-228.

Ciofani, M., Zúñiga-Pflücker, J.C., (2010) Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development, *Nature Reviews Immunology* 10, 657-663.

Cheuk, A. T.C., Mufti, G.J., and Guinn, B., (2004) Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy, *Cancer gene Therapy* 11, 215-226.

Chiron, D., Bekeredjian-Ding, I., Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R. and Jego, G. (2008) Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells, *Blood*, 112:2205-2213.

Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J. and Kwon, B.S. (2009) 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells, *The Journal of Immunology*;, 182:4107-4115.

Choi, M.Y., Kipps, T.J. (2012) Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies, *Cancer J.*; 18 (5):404-10.

Choi, J. W., Lee, H. W., Roh, G. S., Kim, H. H., and Kwack, K. (2005) CD137 induces adhesion and cytokine production in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Mol. Med.* 37, 78–85.

Chu, N.R., DeBenedette, M.A., Stiernholm, B.J., Barber, B.H., and Watts, T.H., (1997) Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells, *The Journal of Immunology*;158:3081-3089.

Cerhan, J. R., Ansell, S.M., Fredericksen ,Z.S., Kay ,N.E., Liebow, M., Call, T.G., Dogan ,A., Cunningham, J.M., Wang, A.H, Liu-Mares, W., Macon, W.R., Jelinek, D., Witzig, T.E., Habermann, T.M., and Slager,S.L, (2007) Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma, *Blood* , 110, 4455-4463 .

Crotty, S., (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH), *Annu Rev Immunol*, 29: p. 621-63.

Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y.(1998) Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptor, *Annu.rev.Immunol.*, 16:523-544.

Dawicki W., Watts T. H. (2004) Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34, 743–751.

Delves, P., (2007) Immune Response, In Fink G (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (pp. 462 - 469): Elsevier.

DeBenedette, M.A, Shahinian, A., Mak, T.W, Watts, T.H., (1997) Costimulation of CD28-T lymphocytes by 4-1BB ligand, *J.Immunol*; 158: 551-559.

Duckett C. S., Gedrich R. W., Gilfillan M. C., Thompson C. B. (1997) Induction of nuclear factor κ B by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol. Cell Biol.* 17, 1535–1542.

Dunn IF., Sannikova, TY., Geha, RS., Tsitsikov, E. (2000) Identification and characterization of two CD40-inducible enhancers in the mouse TRAF1 gene locus, *Mol.Immunol.*; 37: 961-973.

Durkop H., Foss,HD., Demel,G., Klotzbach,H., Hahn,C., Stein,H. (1999) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 is overexpressed in Reed-Sternberger cells of Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus-transformed limphoide cells, *Blood*; 93:617-623.

Edwards, JC., Cambridge, G. (2006) B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases, *Nature Reviews Immunology* 6, 394–403.

Ehrlich, E. (2011) Natural Killer Cells: Innate or Adaptive Immunity? Or Both? SABiosciences, QIAGENcompany(addressweb:<http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/innateadaptiveimmunity.php>)

Elgueta, R., Benson, MJ., de Vries, VC., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, RJ.(2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunol Rev.* 229(1):152-72.

Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C, (2010) Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B, *Gastroenterology.*,Feb;138(2):682-93.

Fisicaro P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Ravanetti,L.,Urbani, S., Guiberti, T., Cavalli, A., Vandelli, C., Andreone, P., Missale, G., Ferrari, C., (2012) Combined blockade of programmed death-1

and activation of CD137 increase responses of human liver T cells against HBV, but not HCV, *Gastroenterology*, Dec; 143(6):1576-1585.

Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Hausser, A., Glauner, H., Samel, D., Graness, A., Scheurich, P., Mauri D., Wajant H., (2004) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation, *J Biol Chem.*; 279(1):677-85.

Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Mittler, R.S., Yagita, H., Ueno, H. (2005) Engagement of 4-1BB inhibits the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *J.Immunol*: 4897-4903.

Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A.(1992) Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb, *Science.*;257(5072): 919-27.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H. and Okumura, K., (2002), Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells, *International Immunology*, Vol.14, No.3,:275-286.

Ganley-Leal, L.M., Liang, Y.M., Jagannathan-Bogdan, M., Farraye, F.A. and Nikolajczyk, B.S. (2010) Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol.Immunol.* 48(1-3) : 82-88.

Germain, R.N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision, *Nature reviews. Immunology* 2, 309-322.

Guo, F., Sun, A., Wang, W., He, J., Hou, J., Zhou, P., Chen, Z. (2009) TRAF1 is involved in the classical NF-κB activation and CD30-induced alternative activity in Hodgkin's lymphoma cells. *Mol. Immunol*, 46, 2441–2448.

Ha, H., Han, D., Choi, Y. (2009) TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr. Protoc. Immunol.* 87:11.9D.1–11.9D.19.

Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., Korsmeyer, S. J. (2004) Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15313–15317.

Harrison, R. E., Sikorski, B. A., Jongstra, J. (2004) Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton, *J. Cell Sci.* 117, 2151–2157.

Harrison, J.M., Bertram, E.M., Ramshaw, I.A., (2006) Exploiting 4-1BB costimulation for enhancing antiviral vaccination, *Viral Immunol.* ; 19(4):593-601.

Henkler F., Baumann B., Fotin-Mleczeck M., Weingärtner M., Schwenzer R., Peters N., Granesse A., Wirth T., Scheurich P., Schmid JA., Wajant H. (2003) Caspase-mediated cleavage converts the TRAF1 from a selective modulator of TNFR signaling to a general inhibitor of NF-κB activation, *J.Biol.Chem.*; 278: 29216-29230.

Hennecke, J., Wiley, D.C. (2002) Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-

DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity, *J. Exp Med.*;195(5):571-81.

Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J., Marrack, P.(2007) Apoptosis and the homeostatic control of immune responses, *Curr. Opin. Immunol.* 19, 516–521.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* 76, 17–27.

Holmstrom, T.H., Schmitz, I., Soderstrom, T.S., Poukkula, M., Johnson, V.L., Chow, S.C., Krammer, P.H., Eriksson, J.E., (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J*, 19(20):5418-5428.

Howard, T. H., Hartwig, J., Cunningham, C. (1998) Lymphocyte-specific protein 1 expression in eukaryotic cells reproduces the morphologic and motile abnormality of NAD 47/89 neutrophils, *Blood* 91, 4786–4795.

Hurtado, J.C., Kim, Y. J., Kwon, B. S. (1997) Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J. Immunol.* 158, 2600–2609.

Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M.D. (2004) MAP kinases and cell migration, *J.Cell Sci.* 117: 4619-4628.

Houot, R., Goldstein, M.J., Kohrt, H.E., Myklebust, J.H., Alizadeh, A.A., Lin, J.T., Irish, J.M., Torchia, J.A., Kolstad, A., Chen, L., Levy, R..(2009) Therapeutic effect of CD137 immunomodulation in lymphoma and its enhancement by T reg depletion. *Blood*, 114: 3431-3438.

Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., Yamamoto, T.(2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family :adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, 254:14–24.

Irmler, M., Steiner, V., Ruegg C., Wajant, H., Tschopp, J. (2000) Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis, *FEBS Lett.* 25; 468(2-3):129-33.

Jacobs, J.FM, Nierkens, S., Figdor, C.G., M de Vries, J. and Adema’G.J. (2012) Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *The Lancet Oncology*, Volume 13, No.1, e32-e42.

Jang, I.K., Lee, Z.H., Kim, Y.J., Kim, S.H., Kwon, B.S. (1998) Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor –kappa B, *Biochem.Biophys. Res Commun*; 242:613-620.

Janeway, Murphy, Travers and Walport, (2009) *Immunobiologie*, Traduction de la 7e édition anglaise, Édition De Boeck Université, Bruxelles, Belgique, (Chapitre 1 et 7).

Jagannathan, M., Hasrurk, H., Liang, Y., Shin, H., Hetzel, J.T., Kantarci, A., Rubin, D., McDonnell, M.E., Van Dyke, T.E., Ganley-Leal, L.M., Nikolajczyk, B.S., (2009) TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients, *J. Immunol*; 183: 7461-7470.

Jongstra-Bilen J., Janmey P. A., Hartwig J. H., Galea S., Jongstra J. (1992) The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain. *J. Cell Biol.* 118, 1443–453.

Jongstra-Bilen, J., Misener, V. L., Wang, C., Ginzberg, H., Auerbach, A., Joyner, A. L., Downey, G. P., Jongstra, J. (2000) LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum. *Blood* 96, 1827–1835.

Jongstra-Bilen, J., Jongstra, J. (2006) Leukocyte-specific protein 1 (LSP1): a regulator of leukocyte emigration in inflammation, *Immunol Res.*; 35(1-2):65-74.

Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F., Ishii, K.J. (2013), Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination, *Frontiers in Cellular and Infection microbiology*, Review article, Volume 2, Article 168.

Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.* 11: 373-384.

Kim, K.M., Kim, H.W., Kim, J.O., Baek, K.M., Kim, J.G., Kang, C.Y. (2002) Induction of 4-1BB (CD137) expression by DNA damaging agents in human T lymphocytes. *Immunology.* ; 107(4):472-9.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A. et Osborne, B.A. (2008) *Immunologie: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*, 6^e édition, Dunod, Paros, France.

Klein, U., Rajewsky, K. and Kuppers, R. (1998) Human immunoglobulin (Ig) M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 188(9): p. 1679-89.

Kurtulus, S., Tripathi, P., Moreno-Fernandez, M. E., Sholl, A., Katz, J. D., Grimes, H. L., Hildeman, D. A. (2011) Bcl-2 allows effector and memory CD8⁺ T cells to tolerate higher expression of Bim. *J. Immunol.* 186, 5729–5737.

Kwon, B.S., Hurtado, J.C, Lee, Z.H., Kwack, K.B., Seo, S.K., Choi, B.K., Koller, B.H., Wolisi, G., Broxmeyer, H.E., Vinay, D.S., (2002) Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice, *J Immunol.* Jun 1; 168(11):5483-90.

Lanier, L.L. (2013), Shades of grey--the blurring view of innate and adaptive immunity, *Nat Rev Immunol.*; 13(2):73-4.

Laderach, D., Movasagh, M., Johnson, A., Mittler, R.S., Gally, A. (2002) 4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8⁺ T cells, *International immunology*:14(10):1155-1167.

LeBien, T.W., Tedder, T.F. (2008) B lymphocytes: how they develop and function, *Blood*; 112(5):1570-80

Lee, T.H., Song, H.J., Park, C.S. (2014) Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma, *Current Review, Asia Pac Allergy* 2014;4:187-196.

- Leo, E.,** Deveraux, Q.L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (2001) TRAF1 is a substrate of caspases activated during Tumor Necrosis Factor Receptor- α -induced apoptosis, *J.Biol. Chem.*, 276: 8087-8093.
- Lee, S.,** Choi Y. (2007) TRAF1 and its biological functions, *Adv.Exp.Med.Biol.*; 597: 25-31.
- Lee, H.W.;** Park, S.J., Choi, B.K., Kim, H.H., Nam, K.O., Kwon, B.S. (2002) 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J. Immunol.* Nov 1; 169(9):4882-8.
- Lee, S.C.,** Ju, S.A., Pack, H.N., Heo, S.K., Suh, J.H., Park, S.M.B., Choi, K., Kwon, B.S., Kim, B.S. (2005) 4-1BB(CD137) is required for rapid clearance of *Listeria monocytogenes* infection. *Infec.Immunol.* 73; 5144-5151.
- Ley, R.,** Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., Cook, S.J.,(2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim, *J Biol Chem.*, May 23;278(21):18811-6.
- Ley, R.,** Ewings, K. E., Hadfield, K., Cook, S. J. (2005) Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ.* 12, 1008–1014.
- Li, Y.,** Zhang, Q., Aaron, R., Lee Hilliard, L. and Thomas H. Howard, T.H. (2000) LSP1 modulates the locomotion of monocyte-differentiated U937 cells, *Blood*; Volume: 96 (3):1100 - 1105
- Lin, G. H.,** Stone, J. C., Surh, C. D., Watts, T. H.(2011) In vivo accumulation of T cells in response to IL-2/anti-IL-2 mAb complexes is dependent in part on the TNF family ligand 4-1BBL. *Immunol. Cell Biol.* 90, 743–747.
- Luz, J.G.,** Huang, M., Garcia, K.C., Rudolph, M.G., Apostolopoulos, V., Teyton, L., Wilson, I.A.(2002) Structural comparison of allogeneic and syngeneic T cell receptor-peptide-major histocompatibility complex complexes: a buried alloreactive mutation subtly alters peptide presentation substantially increasing V(beta) Interactions, *J Exp Med.*;195(9):1175-86.
- Marafioti, T.,** Jabri, L., Pulford, K., Brousset, P., Mason, D. Y., Delsol, G.(2003) Leucocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease. *Br. J. Haematol.* 120, 671–678.
- Marvel, J.,** Walzer, T. (2010), CD137 in NK cells, *Blood*, 115: 2987-2988.
- Melero, I.,** Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., Chen, L. (1998) NK 1.1 cells express 4-1BB(CD137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by 4-1BB monoclonal antibodies. *Cell. Immunol.* 190: 167-172.
- Michel, J.,** Pauly, S., Langstein, J., Krammer, P.H., Schwarz H.(1999) CD137-induced apoptosis is independent of CD95. *Immunology. Sep*; 98(1):42-6.
- Missiou, A.,** Kostlin, N., Varo, N., Rudolf, P., Aichele, P., Ernst, S., Munkel, C., Walter, C., Stachon, P., Sommer, B., Pfeifer, D., Zirlik, K., MacFarlane, L., Wolf, D., Tsitsikov, E., Bode, C., Libby, P., Zirlik, A.(2010) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) deficiency attenuates atherosclerosis in mice by impairing monocyte recruitment to the vessel wall. *Circulation* 121, 2033–2044.

Mishra, R., Chhatbar, C., Singh, S.K.(2012) HIV-1 Tat C-mediated regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor-3 by microRNA 32 in human microglia. *J Neuroinflammation*, 9:131.

Moran, A.E., Kovacovics-Bankowski, M., Weinberg, A. (2013) The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy, *Curr. Opin. Immunol.* 25(2):230-7.

Morgan, M.E., *The IBD Immunologist*, Generation of immune Cells, adresse URL: <http://theibdimmunologist.com/learning/basic-immunology>

Moulding, D.A., Record, J., Malinova, D. and Thrasher, A.J. (2013) Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency, *Immunol. Rev.*; 256(1): 282–299.

Munzert, G., Kirchner, D., Stobbe, H., Bergmann, L., Schmid, R. M., Dohner, H., Heimpel, H.(2002) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF- κ B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis, *Blood* 100, 3749–3756.

Muppidi, J.R., Tschopp, J., Siegel, R.M. (2004) Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, 21:461–465.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., Van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J. Immunol*, 164 : 5998-6004.

Nakaima, Y., Watanabe, K., Koyama, T., Miura, O. and Fukuda T. (2013) CD137 is induced by the CD40 signal on chronic lymphocytic leukemia B cell and transduced the survival signal via NF- κ B activation. *PLoS ONE* 8 (5): e64425,

Nguyen, Q.T., Nguyen, T.H.T., Jum S.A., Lee, Y.S., Han, S.H., Lee, S.C., Kwon, B.S., Yu, R., Kim, G.Y., Lee, B.J., Kim, B.S. (2013) CD137 expressed on neutrophils plays dual roles in antibacterial responses against gram-positive and gram-negative bacterial infections, *Infection and Immunity*, 81(6) : 2168-2177.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H, Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., Croft, M., Kawakami, T. (2005) Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high affinity IgE receptor. *Blood*, 106: 4241-4248.

Olive, D., (2006) Corécepteurs lymphocytaires, *Médecine sciences*, vol.22, n°12, p.1069.

Opferman, J. T., Korsmeyer, S. J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4, 410–415.

Oyoshi, M. K., Barthel, R., Tsitsikov, E. N.(2007) TRAF1 regulates recruitment of lymphocytes and, to a lesser extent, neutrophils, myeloid dendritic cells and monocytes to the lung airways following lipopolysaccharide inhalation. *Immunology* 120, 303–314.

Owen, J.A., Punt, J. and Stranford, S. (2014) *Kuby, Immunologie*, 7^e edition, Dunod, Paris, Chapitre 16, p.515-525.

Parekh, V.V., Prasad, V.R., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A. and Mishra, G. (2003) B cell activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-Cd40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF- β 1, *J. Immunol*, 170:5897-5911.

Palma, C., Binaschi, M., Bigioni, M., Maggi, C.A., Goso, C.(2003) CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer.*; 108(3):390-398.

Peppas, D., Gill, U.S., Reynolds, G., Easom, N.J., Pallett, L.J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H.D., Adams, D.H., Kennedy, P.T., Maini, M.K. (2013) Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion, *J Exp Med*. Jan 14; 210(1): 99-114.

Polok, K.E., Kim, Y.J., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K.K. and Kwon, B.S. (1994) 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulated anti- μ -primed splenic B cells. *Eur.J.Immunol*. 24: 367-374.

Pulle, G., Vidric, M., Watts, T. H. (2006) IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J. Immunol*. 176, 2739–2748.

Pullen, S.S., Miller, H.G., Everdeen, D.S., Dang, T.T., Crute, J.J., Kehry, M.R.,(1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization, *Biochemistry.*;37(34):11836-45.

Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y., Germain, R.N. (2006) Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells, *Science*; 312(5780):1672-6.

Qiagen, <https://www.qiagen.com/ca/geneglobe>, TNF Superfamily Pathway,

Rawlings, D.J., Schwartz, M.A., Jackson, S.W. and Meyer-Bahlburg, A. (2012) Integration of B cell response through Toll-like receptor and antigen receptors, *Nat.rev.Immunol*, 12: 282-294.

Romagnani, S. (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2) *Ann Allergy Asthma Immunol.* ; 85:9–21.

Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V.(1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681–692.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., Goeddel, D.V.(1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243–1252.

Sabbagh, L., Srokowski, C.C., Pulle, G., Snell, L.M., Sedgmen, B.J., Liu, Y., Tsitsikov, E.N., Watts T. H.(2006) A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18703–18708.

Sabbagh L., Snell, L. M., Watts, T. H. (2007) TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol*. 28, 333–339.

- Sabbagh, L.,** Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E. N., Watts, T. H. (2008) ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J. Immunol.* 180, 8093–8101.
- Sabbagh, L.,** Andreeva, D., Dubeau-Laramée, G., Oussa, E. N.A., Lew, D., Bisson, N., Soumounou, Y., Pawson, T., and Watts, T.H., (2013) Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 93, 713-721.
- Salih, H. R.,** Schmetzer, H.M., Burke, C., Starling, G.C., Dunn, R., Pelka-Fleischer, R., Nuessler, V., Kiener, P.A. (2001) Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies, *J Immunol.*; 167(7):4059-66.
- Saoulli, K.,** Lee, S.Y., Cannons, J.L., Yeh, W.C., Santana, A., Goldstein, M.D., Bangia, N., DeBenedette, M.A., Mak, T.W., Choi, Y., Watts, T.H, (1998) CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand, *J Exp Med.* ;187(11):1849-62.
- Schaer, D.A.,** Hirschhorn-Cymerman, D., Wolchok., JD., (2014) Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2:7.
- Schwenzer, R.,** Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R. M., Wajant, H. (1999) The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 19368–19374.
- Shekhar, S.,** Yang, X., (2012) The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency, *Cellular & Molecular Immunology*; 9, 380–385.
- Shin, H.,** Zhang, Y., Jagannathan, M., Hasturk, H., Kantarci, A., Liu, H., VanDyke, T.E., Ganley-Leal, L. M., Nikolajczyk, B.S. (2009) B cells from periodontal disease patients express surface Toll-like receptor 4, *J. Leukoc. Biol.*; 85:648-655.
- Siggs, O.,** Kalina, S. Murray, A., Beutler, B., (2013) Phenotypic Mutation *allia*, MUTAGENETIX^(TM), Department of Genetics, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA. Web URL: mutagenetix.utsouthwestern.edu
- Shuford, W.W.,** Klussman, K., Tritchler, D.D., Loo, D.T., Chalupny, J., Siadak, A.W., Brown, T.J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Mittler, R.S. (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med.*, Jul 7; 186(1):47-55.
- Smith-Garvin, J E.,** Koretzky, G. A., and Jordan, M.S. (2009) T cell Activation, *Annu. Rev. Immunol*, 27:591–619.
- Speiser, D.E.,** Lee, S.Y., Wong, B., Arron, J., Santana, A., Kong, Y.Y., Ohashi, P.S., Choi, Y., (1997) A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cell, *J.Exp.Med.*; 185: 1777-1783.
- Takahashi, C.,** Mittler, R. S., Vella, A. T. (1999) Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J. Immunol.* 162, 5037–5040.

Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., Larsen, C.P. (1999) 4-1BB Ligand, a member of the TNF Family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses, *The Journal of Immunology*, 163: 4859-4868.

Tsitsikov, E. N., Laouini, D., Dunn, I. F., Sannikova, T. Y., Davidson, L., Alt, F. W., Geha, R. S.(2001) TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. Enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity*, 15, 647–657.

Twohig, J.P., Cuff, S.M, Yong, A.A, Wang, E.C (2011) The role of tumor necrosis factor receptor superfamily members in mammalian brain development, function and homeostasis. *Rev Neurosci* , 22:509–533.

Uematsu, Y., Ryser,S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, Von Boehmer, H. and Steinmetz, M. (1988) In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52:831-841.

Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L., Karin, M.(2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- κ B signaling. *Nat. Immunol.* 9, 1364–1370.

Van Endert, P.(2006) Apprêtement des antigènes présentés par les molécules de classe I du CMH, *M/S : médecine sciences*, vol. 22, n° 8-9, 2006, p. 727-732.

Vinay D.S., Kwon B.S.(2014), 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy, *BMB reports*; 47(3).

Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., Mond, J.J. (2000) B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*, 176: 154-70.

Wang, C., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S. (1998) NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science*; 281: 1680-1683.

Wang, C., Hayashi, H., Harrison, R., Chiu, B., Chan, J. R., Ostergaard, H. L., Inman, R. D., Jongstra, J., Cybulsky, M. I., Jongstra-Bilen, J.(2002) Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. *J. Immunol.* 169, 415–423.

Wang, C., Wen, T., Routy, J. P., Bernard, N. F., Sekaly, R. P., Watts, T. H.(2007) 4-1BBL induces TNF receptor-associated factor 1-dependent Bim modulation in human T cells and is a critical component in the costimulation-dependent rescue of functionally impaired HIV-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 179, 8252–8263.

Wang C., Lin G., McPherson A.J., Watts, T., (2009) Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges, *Immunological Reviews*, Vol.229: 192-215.

Wang C., McPherson A.J, Jones R.B, Kawamura K.S., Lin G.H., Lang P.A., Ambagala T., Pellegrini M., Calzascia T., Aidarus N., Elford A.R., Yue F.Y., Kremmer E., Kovacs C.M., Benko E., Tremblay C., Routy J.P., Bernard N.F., Ostrowski M.A., Ohashi P.S., Watts T.H.,(2012) Loss of the signaling

adaptor TRAF1 causes CD8⁺ T cell dysregulation during human and murine chronic infection, *J Exp Med*, Vol. 209:77-91.

Watts, T.H., Lin, G.H., Wang, C., McPherson, A.J., Snell, L.M., and Sabbagh, L., (2011) Role of 4-1BBL and TRAF1 in the CD8 T cell response to influenza virus and HIV. *Adv Exp Med Biol.*; 691:177-86.

Wajant, H., Henkler, F., Scheurich, P. (2001) The TNF-receptor-associated factor family. Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal*, 13:389–400.

Wen T., Bukczynski J., Watts T.H. (2002) 4-1BB Ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T Cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function, *The Journal of Immunology*; 168: 4897– 4906.

Weerkamp, F., Overzet, KP. , Staal, FJ. (2006) T-sing progenitors to commit, *Trends in Immunology* 27, 125–131.

Weintraub, A. (2003) Immunology of bacterial polysaccharide antigens, *Carbohydr Res.* ; 338(23):2539-47.

Wicovsky, A., Henkler, F., Salzman, S., Scheurich, P., Kneitz, C., Wajant, H.(2009) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28, 1769–1781.

Wicovsky, A., Salzman, S., Roos, C., Ehrenschrwender, M., Rosenthal, T., Siegmund, D., Henkler, F., Gohlke, F., Kneitz, C., Wajant, H.:(2009) TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling, *Cell Death Differ* , 16:1445–1459.

Xie, P., Hostager, B. S., Munroe, M. E., Moore, C. R., Bishop, G. A.(2006) Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J. Immunol.* 176, 5388–5400.

Xie, P. (2013) TRAF molecules in cell signaling and in human diseases, *Journal of molecular Signaling*, 8:7.

Xu, Y., Cheng, G., Baltimore, D. (1996) Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses, *Immunity*; 5: 407-415.

Yeh, W. C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., Pompa, J. L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D. V., Mak, T. W.(1997) Early lethality, functional NF-κB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715–725.

Yi, L., Zhao, Y., Wang, X., Dai, M., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Zhang, H. (2014), Human and mouse CD137 have predominantly different binding CRDs to their respective ligands, *PLoS One.* 9(1): e86337.

Zamoyska, R. (1998) CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol.* ; 10(1):82-7.

Zapata, J. M., Krajewska, M., Krajewski, S., Kitada, S., Welsh, K., Monks, A., McCloskey, N., Gordon, J., Kipps, T. J., Gascoyne, R. D., Shabaik, A., Reed, J. C. (2000) TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J. Immunol.* 165, 5084–5096.

Zapata, J. M., Reed, J. C. (2002) TRAF1: lord without a RING. *Sci. STKE*, PE27.

Zapata, J.M., Lefebvre, S., Reed, J.C. (2007) Targeting TRAFs for therapeutic intervention, *Adv.Exp.Med.Biol.* 597: 188-201.

Zastepa, E., Fitz-Gerald, L, Hallett, M., Antel, J., Bar-Or, A., Baranzini, S., Lapierre, Y., Haegert, D.G.(2014) Naive CD4 T-cell activation identifies MS patients having rapid transition to progressive MS. *Neurology.*;82(8):681-90.

Zheng, G., Wang, B., Chen, A. (2004) The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*; 173:2428–34.

Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E. N., Ding, H. F.(2007) NF- κ B2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743–751.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, CL., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., Hertzano, R., Chapoval, A.I., Tamada, K., Gastman, B.R., Schulze, D.H., Strome, S.E. (2010) CD137 promotes proliferation and survival of human B cells, *J. Immunology*;184; 787-795.

Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., Wu, H. (2010) Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol. Cell* 38, 101–113.

Zhu, Y., Zhu, G., Flies, AS., Chen, L. (2007) CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype, *Blood* 109:4882-4889.

