

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

# **LE RÔLE DE LA PROTÉINE FRIZZLED 6 DANS LES LYMPHOCYTES B INNÉS "B1A"**

Par  
Sarra Labidi

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Alain Lamarre  
INRS- Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Johanne Poudrier  
Département de Microbiologie,  
Infectiologie et Immunologie  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Krista Heinonen  
INRS- Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie



## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche, Pre. Krista Heinonen, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire pour effectuer mon stage de fin d'études et pour poursuivre ensuite à la maîtrise. J'ai beaucoup apprécié sa passion ainsi que son talent à expliquer le monde fascinant, mais complexe du système immunitaire. Merci de m'avoir transmis cette passion, pour l'encadrement, le soutien, et pour nos discussions scientifiques qui sont très enrichissantes pour moi. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement les membres du jury, le Pr. Alain Lamarre et la Pre. Johanne Poudrier qui me font l'honneur de juger ce modeste travail de maîtrise.

Je remercie aussi tous les membres de notre laboratoire Roxann, Mouna, Trieu, Fabio et Sarah pour leur aide. Sans oublier mes collègues Linh, Liseth, Tanja et Sharada pour la belle ambiance au bureau.

Je souhaite remercier de tout mon cœur mes parents Mohamed et Melika qui ont su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Votre amour et vos encouragements ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir fait de moi ce que je suis. Mon merveilleux frère Ramzi, merci d'être toujours présent à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Tu es aimé plus que tu ne le sais et tu me manques énormément. J'espère qu'on se verra bientôt ! Ainsi que mon frère Salim, vous deux vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Je remercie aussi mon mari Nadhir de me soutenir malgré la distance et de me garder toujours motivée.

Je remercie mes chers amis et ma deuxième famille au Canada Rihab, Asma, Sabrine, Nahla, Oussema et Ahmed qui m'ont beaucoup aidé et qui ont été toujours présents dans les bons comme dans les moins bons moments.

Finalement, j'ai eu la chance de rencontrer et d'étudier avec les meilleures collègues du cours, mes chères amies Sarah, Anaïs et Léna avec qui j'ai partagé de très bons souvenirs durant cette aventure. Merci pour tout et je vous souhaite tout le succès dans vos parcours !



## RÉSUMÉ

---

À l'état normal, les lymphocytes B innés « B1a » se trouvent principalement dans la cavité péritonéale, et se maintiennent durant la vie adulte par auto-renouvellement. En cas d'infection, ils se différencient en une population sécrétrice d'anticorps et de cytokines, qui protègent l'organisme contre la septicémie. Notre laboratoire a montré que le récepteur Frizzled6 (Fzd6) promeut l'auto-renouvellement des cellules souches. Fait intéressant, le gène *Fzd6* est fortement exprimé dans les B1a péritonéales, mais, son rôle reste inconnu chez ces cellules. Nous avons émis l'hypothèse que Fzd6 serait impliquée dans le maintien et dans la fonction des B1a. Dans ce contexte, nous visons à déterminer l'implication de Fzd6 dans ces processus des cellules B1a. Nous avons comparé des souris contrôles (WT) et des souris déficientes en Fzd6 (KO) à l'état normal et après une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats ont montré que Fzd6 n'est pas nécessaire pour le maintien des cellules B1a à l'état d'équilibre. L'analyse de la réponse des souris WT et KO aux injections de LPS *in vivo* a montré que les cellules B activatrices de la réponse innée (IRA) dérivant de B1a sont plus présentes dans la rate des souris Fzd6 KO par rapport aux WT. De plus, les B1a KO donnent plus de cellules IRA en culture en réponse aux LPS *in vitro*. Ceci suggère que la déficience en Fzd6 augmente la sensibilité des cellules aux LPS. En outre, les progéniteurs B1 Fzd6 KO s'expandent plus dans la moelle osseuse. En conclusion, l'absence de Fzd6 rend les cellules B1a plus sensibles aux LPS sans affecter leur maintien à l'état normal.

**Mots clés :** Frizzled6, lymphocytes B1a, cellules activatrices de la réponse innée (IRA), septicémie, auto-renouvellement, lipopolysaccharides (LPS), progéniteurs B1.

## ABSTRACT

---

Innate B cells "B1a" are present mainly in the peritoneal cavity at steady state and are maintained during adult life by self-renewal. In case of an infection, they differentiate into a population of antibody and cytokine secreting cells that protect against sepsis. Our laboratory has shown that Frizzled6 receptor promotes self-renewal of stem cells. Interestingly, the Fzd6 gene is overexpressed in peritoneal B1a cells but its role remains unknown in these cells. We hypothesized that it would be involved in the maintenance and the function of B1a. In this context, we compared B1a cells in control (WT) and Fzd6 knockout (KO) mice at steady state and after lipopolysaccharides (LPS) stimulation *in vivo* and *in vitro*. Our results showed that Fzd6 is unnecessary in the maintenance of B1a cells at steady state. In contrast, innate response activators B cells (IRA) were more numerous in the spleen of Fzd6 KO mice compared with the WT in response to LPS. In addition, Fzd6 KO B1a proliferate and/or differentiate more into IRA *in vitro*, suggesting an increased sensitivity in response to LPS. Moreover, there are more Fzd6 KO B1 progenitors in the bone marrow. In conclusion, the absence of Fzd6 promotes the mobilization of B1a and increase its sensitivity in response to LPS without affecting their maintenance at steady state.

**Keywords** : Frizzled6, B1a Lymphocytes, Innate response activators (IRA), sepsis, self-renewal, lipopolysaccharides (LPS), B1 progenitors.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ .....	V
ABSTRACT .....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités sur les réponses immunitaires.....	1
1.1.1 <i>La réponse immunitaire innée</i> .....	1
1.1.2 <i>La réponse immunitaire adaptative</i> .....	2
1.2 Les lymphocytes B .....	3
1.2.1 <i>Les lymphocytes B conventionnels (B2)</i> .....	4
1.2.2 <i>Les lymphocytes B innés (B1)</i> .....	5
1.2.3 <i>Ontogénèse des lymphocytes B1</i> .....	8
1.3 Les lymphocytes B1a .....	11
1.3.1 <i>Phénotype des B1a</i> .....	14
1.3.2 <i>Rôle physiologique des lymphocytes B1a</i> .....	14
1.3.3 <i>Les cellules activatrices de la réponse innée (IRA)</i> .....	17
1.4 Les voies de signalisation Wnt/Fzd .....	19
1.4.1 <i>La voie canonique Wnt/β-caténine</i> .....	21
1.4.2 <i>La voie non canonique Wnt/Ca<sup>2+</sup></i> .....	21
1.4.3 <i>La voie non canonique Wnt/JNK ou la voie « Planar cell polarity » PCP</i> .....	22
1.4.4 <i>La signalisation Wnt dans les lymphocytes B</i> .....	24
1.5 La protéine Frizzled6.....	26
1.5.1 <i>Fonction</i> .....	27
1.5.2 <i>Le rôle de Fzd6 dans les cellules hématopoïétiques</i> .....	31
1.5.3 <i>Le taux d'expression du gène Fzd6 dans différentes populations B</i> .....	31
<b>2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>33</b>

<b>3</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>35</b>
3.1	Le modèle animal.....	35
3.2	Euthanasie des souris.....	35
3.3	Préparation des tampons utilisés .....	35
3.3.1	<i>Tampon de cytométrie en flux (Tampon CF)</i> .....	35
3.3.2	<i>Tampon de lavage péritonéal</i> .....	35
3.4	Prélèvement des organes et préparation des suspensions cellulaires.....	36
3.4.1	<i>Récolte d'organes ex vivo</i> .....	36
3.4.2	<i>Comptage des cellules</i> .....	36
3.5	Préparation des échantillons à analyser par cytométrie en flux .....	37
3.5.1	<i>Marquage extracellulaire des cellules</i> .....	37
3.5.2	<i>Marquage intracellulaire du GM-CSF produit par les IRA</i> .....	39
3.6	Détermination de la sensibilité aux LPS <i>in vivo</i> .....	40
3.7	Enrichissement en cellules B1a et mise en culture <i>In vitro</i> .....	41
3.8	Isolation des progéniteurs B1 .....	42
3.8.1	<i>Isolation des progéniteurs B1 des moelles osseuses adultes</i> .....	42
3.8.2	<i>Isolation des progéniteurs B1 des foies foetaux</i> .....	42
3.9	Cytométrie en flux .....	43
3.10	Statistiques .....	43
<b>4</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Frizzled6 n'est pas nécessaire pour le maintien des cellules B1a dans les conditions normales .....	44
4.2	L'absence du gène <i>Fzd6</i> entraîne une tendance à la hausse des cellules IRA et une diminution de production de GM-CSF par les IRA <i>in vivo</i> .....	47
4.3	La protéine <i>Fzd6</i> atténue l'accumulation des IRA et favorise la production de GM-CSF <i>In vitro</i> .....	50
4.4	L'absence de <i>Frizzled6</i> induit l'expansion des progéniteurs B1 présents dans la moelle osseuse .....	54
<b>5</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>56</b>
5.1	Frizzled6 n'a pas d'impact sur le maintien des cellules B1a dans les conditions homéostatiques.....	57



5.2	L'absence du gène <i>Fzd6</i> entraîne une tendance à la hausse des cellules IRA et une diminution de production de GM-CSF par les IRA <i>in vivo</i> .....	59
5.3	La protéine Fzd6 atténue l'accumulation des IRA et favorise la production de GM-CSF <i>In vitro</i> .....	61
5.4	L'absence de Frizzled6 induit l'expansion des progéniteurs B1 présents dans la moelle osseuse .....	63
<b>6</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>68</b>

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1.1	Les deux sous-populations de lymphocytes B .....	4
Figure 1.2	Modèle proposé des vagues principales de développement des cellules B1a .....	11
Figure 1.3	L'origine et la fonction des cellules B activatrices de la réponse innée (IRA) .....	19
Figure 1.4	Les différentes voies de signalisation Wnt/Fzd .....	24
Figure 1.5	Représentation schématique simplifiée de la protéine Frizzled6 .....	27
Figure 1.6	Comparaison de l'orientation des poils chez les souris Fzd6 KO et Fzd6 WT .....	29
Figure 1.7	Expression des gènes <i>Fzd</i> dans les différentes populations de lymphocytes B .....	32
Figure 3.1	Schéma simplifié de l'enrichissement en B1a et leur mise en culture .....	42
Figure 4.1	Frizzled6 n'a pas d'impact sur le maintien des cellules B1a dans les conditions homéostatiques .....	46
Figure 4.2	L'impact de Fzd6 dans la perte de poids corporel post-stimulation par LPS .....	48
Figure 4.3	Une tendance à la hausse du nombre de cellules IRA Fzd6 KO dans la rate <i>in vivo</i> .....	49
Figure 4.4	En absence de Fzd6 il y' a moins des cellules IRA productrices de GM-CSF .....	50
Figure 4.5	Les B1a Fzd6 KO sont plus sensibles à la stimulation par LPS <i>in vitro</i> .....	52
Figure 4.6	La protéine Fzd6 atténue l'accumulation des IRA .....	53
Figure 4.7	Fzd6 contrôle l'expansion des progéniteurs B1 dans la moelle osseuse mais pas au niveau du foie foetal .....	55
Figure 6.1	Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans notre présente étude .....	67

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1.1	Tableau comparatif entre les cellules B1 murines et humaines .....	8
Tableau 1.2	Tableau comparatif entre les cellules B1 innées et les B2 conventionnelles.....	14
Tableau 3.1	Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les B1a de la rate, la cavité péritonéale et la moelle osseuse ainsi que les fractions des progéniteurs B dans la moelle osseuse dans les conditions homéostatiques .....	38
Tableau 3.2	Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA de la rate, la cavité péritonéale et la moelle osseuse <i>in vivo</i> .....	38
Tableau 3.3	Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA obtenus en culture <i>in vitro</i> .....	38
Tableau 3.4	Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les progéniteurs B1 de la moelle osseuse et le foie fœtal dans des conditions homéostatiques .....	39
Tableau 3.5	Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire et intracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA de la rate <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	40

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

Ag Antigène

AGM *Aorta-Gonad-Mesonephros*

APC *Adenomatous polyposis coli*

BAFF *B-cell activating factor*

Bcl-2 *B cell lymphoma-2*

BCR Récepteur des cellules B

Ca<sup>2+</sup> Ion calcium

CamKII Protéine kinase II dépendante de calmoduline

CD *Cluster of differentiation*

cdc42 *Cell division cycle 42*

CDR *Complementarity determining regions*

CEH Cellules endothéliales hémogéniques

CH Cellules hématopoïétiques

CK1 *Caséine kinase 1*

CLP *Common lymphoid progenitors*

CRD Domaine riche en cystéines

CSH Cellules souches hématopoïétiques

CXCL-13 *CXC chemokine ligand 13*

DAG *Diacylglycérol*

*Dfz Drosophille frizzled*

DVL *Dishevelled*

FO Folliculaires

Fzd Protéine Frizzled

*Fzd6 Frizzled 6 murin*

FZD6 *FRIZZLED 6* humain

GM-CSF *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GPCR Récepteurs couplés aux protéines G

GSK3 Glycogène synthase kinase 3

i.p intrapéritonéale

Ig Immunoglobulines

IgM Immunoglobuline M

IL-10 Interleukine-10

IL-3 Interleukine-3

IL-7 Interleukine-7

IP3 Inositol 1,4,5-trisphosphate

IP3R Récepteurs IP3

IRA *Innate response activators*

JNK *c-Jun N-terminal kinase*

KO *Knock-out*

LB Lymphocytes B

LB1 Lymphocytes B1

LB2 Lymphocytes B2

LEF Facteurs de liaison aux activateurs de lymphocytes

LFA-1 *Lymphocyte function-associated antigen-1*

LLC Leucémie lymphoïde chronique

LPS Lipopolysaccharides

LRP5/6 *LDL receptor-related proteins 5 and 6*

MO Moelle osseuse

Myd88 Gène de la réponse primaire de la différenciation myéloïde 88

NF-AT *Nuclear factor of activated T-cells*

NF- $\kappa$ B *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PAMP *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PCP *Planar cell polarity*

PEM *Progéniteurs érythro-myéloïdes*

PIP2 *Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate*

PKC *Protéine kinase C*

PLC *Phospholipase C*

PRR *Pattern Recognition Receptors*

Rac *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

Rho *Ras homolog gene family member*

ROCK *RHO Kinase*

RyR *Récepteurs ryanodine*

STAT3 *Signal transducer and activator of transcription 3*

TCF *Facteur des cellules T*

TCR *Récepteur des cellules T*

TdT *Terminal desoxynucleotidyl transferase*

TLR *Toll Like Receptor*

VLA-4 *very late antigen-4*

Wnt *Wingless/Int-1*

WT *Wild-type, sauvage*

ZM *Zone marginale*

# 1 INTRODUCTION

---

Notre environnement est peuplé d'une grande variété de microbes pathogènes tels que les virus, les bactéries, les champignons, les parasites, etc. En effet, l'Homme demeure exposé en permanence aux agressions microbiennes et parasitaires ainsi qu'aux dérèglements cellulaires. Malgré la grande diversité des micro-organismes et malgré leurs dangers, l'Homme fait preuve d'une résistance remarquable contre eux. En effet, l'ensemble des moyens de défense constitue l'immunité naturelle réalisée par le système immunitaire. Ce dernier a acquis durant l'évolution, un puissant arsenal d'armes défensives qui lui permet de protéger l'organisme contre des envahisseurs potentiels et les agents externes dits pathogènes (le non-soi) (Berthelot *et al.*, 2012). D'autres découvertes montrent qu'il est aussi impliqué dans l'élimination des agressions internes à l'organisme (le soi altéré): cellules mortes ou cellules tumorales par exemple (Janeway Jr *et al.*, 2001).

## 1.1 Généralités sur les réponses immunitaires

### 1.1.1 La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est une réponse rapide, non spécifique servant comme première ligne de défense face aux pathogènes. Cette ligne de défense est représentée par les barrières physiques externes, tels que la peau et les muqueuses renforcées par des défenses chimiques (sueur, larmes, etc.) (Turvey & Broide, 2010). La deuxième ligne de défense est constituée principalement par les cellules polynucléaires ou granulocytes qui, après la pénétration d'un corps étranger dans l'organisme, se dirigent au foyer infectieux et éliminent le pathogène par différents mécanismes. Dans certains cas, les pathogènes peuvent provoquer une infection, ce qui génère une réponse localisée. C'est la réaction inflammatoire (Kaur & Secord, 2019). Dans le cas d'une infection persistante et généralisée dans tout l'organisme, cette réaction inflammatoire devient aiguë et systémique et pourrait même devenir chronique.

#### 1.1.1.1 Les cellules de la réponse innée

Les cellules de la réponse immunitaire innée sont : les monocytes/macrophages, les granulocytes polymorphonucléaires, les cellules dendritiques, les mastocytes, les naturel killer, quelques populations de cellules lymphocytaires et les cellules épithéliales (exemple : celles formant la

peau, les tractus : gastro-intestinal, génito-urinaire et respiratoire) (Aziz *et al.*, 2015; Turvey & Broide, 2010).

### 1.1.1.2 Les récepteurs TLR « *Toll Like Receptor* »

Afin de déclencher une réponse immunitaire, notre corps détecte les agents pathogènes grâce aux récepteurs du soi. Ces derniers, désignés PRR « *Pattern Recognition Receptors* », sont présents majoritairement sur la surface des cellules de l'immunité innée (Kawai & Akira, 2010). La reconnaissance du pathogène est médiée alors par l'interaction entre les récepteurs PRR et les molécules exogènes du non-soi, produites uniquement par les microbes, nommées les PAMP « *Pathogen Associated Molecular Patterns* » (Sarhan *et al.*, 2018). Les récepteurs de type Toll « *Toll Like Receptor* » (TLR), faisant partie des récepteurs PRR, ont été premièrement identifiés chez la drosophile comme étant un composant important dans le développement de la polarité dorso-ventrale embryonnaire et dans l'immunité antifongique. Mais, il a été montré, ensuite, que les mammifères en possèdent également (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997). La famille des récepteurs TLR composée de 10 membres (Imler & Hoffmann, 2001) est divisée essentiellement en deux sous-groupes selon leurs localisations. Les TLR3, 7, 8 et 9 reconnaissant les acides nucléiques microbiens et se trouvent sur les membranes des vésicules intracellulaires (réticulum endoplasmique, les endosomes, lysosomes et endolysosomes). Les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 se localisent sur la surface membranaire extracellulaire (Arleevskaya *et al.*, 2020; Takeda *et al.*, 2003). Ces TLR peuvent répondre à une variété de stimuli et de ligands microbiens y compris les composants des membranes externes des bactéries à Gram négatif, les lipopolysaccharides (LPS). Cette endotoxine (LPS) reconnus par le récepteur TLR4, qui se trouve aussi sur les lymphocytes B chez la souris, peut même engendrer dans certains cas une choc endotoxique/septique (Akira *et al.*, 2006). En fait, les récepteurs « PRR » possèdent un rôle important dans l'activation des voies de signalisation, l'initiation des réponses immunitaires et inflammatoires (Charles A. Janeway & Medzhitov, 2002) mais ils peuvent contribuer, dans certains cas, aux maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes systémiques (Kawai & Akira, 2010; Marshak-Rothstein, 2006).

### 1.1.2 La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative ou « acquise » est mobilisée, dans la plupart des cas, quand la réponse immunitaire innée s'avère inefficace. Elle consiste à mettre en œuvre une défense plus spécifique, diversifiée, durable mais plus lente contre les pathogènes. Et ce, grâce aux



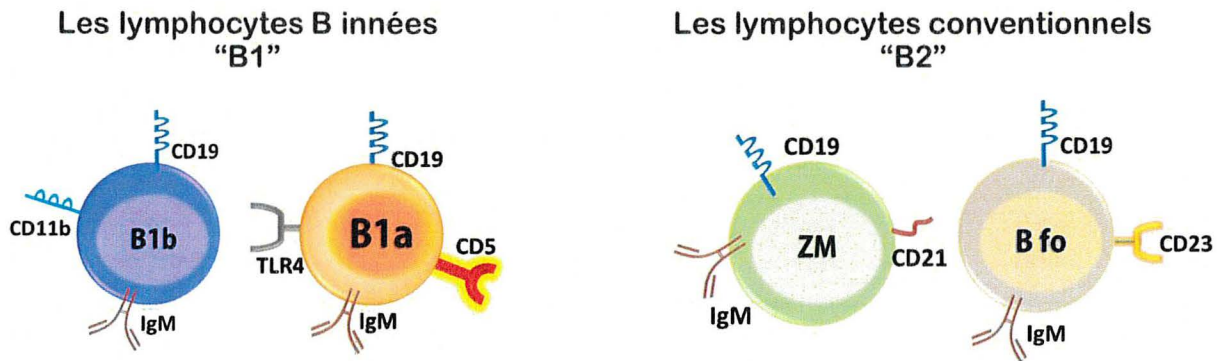
cellules spécialisées, « les lymphocytes », disposant à leur surface des récepteurs spécifiques d'un antigène (Ag). Suite à leur activation et leur sélection clonale en réponse à un antigène spécifique, les lymphocytes T (dérivés du Thymus) et les lymphocytes B (dérivés de *Bourse de Fabricius* chez les oiseaux) exprimant respectivement les TCR (Récepteur des cellules T) et BCR (Récepteur des cellules B), prolifèrent et se différencient en effecteurs afin de permettre une destruction ciblée du pathogène (Cooper & Alder, 2006).

## 1.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) ont un rôle clé dans l'immunité humorale grâce à leur capacité de sécréter des anticorps solubles spécifiques d'un antigène donné afin de le neutraliser (Daruna, 2012). Classiquement, les LB expriment des récepteurs d'antigène, leurs BCR, qui peuvent reconnaître divers épitopes antigéniques spécifiques (Pers *et al.*, 2008). En présence de l'antigène et suite à leur interaction avec les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup>, les LB activés subissent une prolifération importante formant ainsi le centre germinatif. Après avoir subi leur hypermutation somatique et leur recombinaison de commutation de classe, les LB activés évoluent en cellules B mémoires circulantes et en plasmocytes à long terme sécréteurs d'immunoglobulines (Ig) à haute affinité dirigées contre l'antigène libre ou fixé sur les membranes cellulaires (Randall, 2010). Chez l'adulte, la population hétérogène des cellules B matures est formé majoritairement des lymphocytes de type B2 conventionnels incluant : les lymphocytes B folliculaires (FO), les cellules B transitionnelles, celles du centre germinatif et les LB mémoires (Rothstein *et al.*, 2013) ainsi que des lymphocytes B classés comme des effecteurs de la réponse immunitaire innée (Martin & Kearney, 2000). Ces derniers sont formés des LB de la zone marginale (ZM) (retenus constamment en périphérie de la rate dans le sinus marginal) et des lymphocytes B1 (dans les cavités péritonéale et pleurale). Elles sont responsables de la génération d'une mémoire immunitaire naturelle (Martin & Kearney, 2001). Les LB1 constituent les producteurs majeurs des anticorps naturels de type IgM. Les LB de la ZM productrices, également, des IgM naturels sont impliqués essentiellement dans la réponse contre les pathogènes transmis par le sang, les organismes encapsulés et leurs antigènes non protéiques (Dunn-Walters *et al.*, 1995; Kaveri *et al.*, 2012; Martin & Kearney, 2000; Martin & Kearney, 2001).

L'existence, dans un organisme en absence d'infection, de ces anticorps naturels, permet de subdiviser les cellules B, selon leur phénotype, leur localisation anatomique, leur capacité d'auto-renouvellement et leur production des anticorps « naturels », en deux lignées distinctes :

Les LB conventionnels nommés « B2 » et une population unique d'origine foetal nommée « B1 » (Berland & Wortis, 2002; Hardy & Hayakawa, 2001) (**Figure 1.1**) .



**Figure 1.1** Les deux sous-populations de lymphocytes B

Les lymphocytes B innés « B1 » sont composés de LB1a et des LB1b. Les lymphocytes B conventionnels « B2 » sont composés de LB de la zone marginale (ZM) et des LB folliculaire (B fo). Inspirée de (Castañeda-Sánchez *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Les lymphocytes B conventionnels (B2)

Les Lymphocytes B2 découlent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui peuplent la moelle osseuse (MO) grâce à deux étapes indépendante et dépendante de l'antigène, respectivement. La première étape se déroule dans l'organe lymphoïde primaire, la moelle osseuse, où les précurseurs lymphoïdes commun (CLP) dérivés des CSH donnent naissance aux progéniteurs B les plus immatures « **pré-pro-B** » nommés également « **Fraction A** » possédant le phénotype  $CD19^- IgM^- IgD^- (CD45R) B220^+$  (Li *et al.*, 1996). Ensuite, et après avoir constitué la chaîne lourde de type «  $\mu$  » de BCR, les progéniteurs B « **pro-B** » sont donc formés (Osmond *et al.*, 1998).

Une recombinaison des fragments VL et JL (au niveau du locus  $\kappa$  ou  $\lambda$ ), permettent le développement d'une pseudo-chaîne légère. Ensemble, les protéines  $\lambda 5$  et V-preB de cette chaîne, les hétérodimères  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  (CD79b) (responsable de la signalisation intracellulaire) ainsi que la chaîne lourde  $IgHC\mu$ , forment le **pré-BCR** dont l'expression temporaire engendre le passage au stade « **pré-B** ». Les cellules de ces deux derniers stades sont désignées par la « **Fraction B-D** » exprimant le phénotype  $CD19^+ IgM^- IgD^- B220^+$  (Melchers *et al.*, 2000). Éventuellement, les pré-B sont engagés dans l'expansion clonale et la sélection négative est initiée afin d'éliminer les cellules auto-réactives, après avoir effectué un autre réarrangement productif de la chaîne légère (Hall & Yates, 2010).

Lorsque la chaîne légère définitive est produite, le récepteur BCR des LB devient complet de type IgM et gagne la surface cellulaire. Dans ce cas, les LB immatures transitionnels appelés « **Fraction E** » sont sujets à une sélection négative (où les cellules B auto-réactives intolérantes au soi sont sélectionnées négativement en induisant leur apoptose). Les cellules vivantes tolérantes au soi acquièrent le phénotype CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>.

Les cellules qui survivent migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont continuer leur maturation formant ainsi « **la fraction F** » CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>. C'est la deuxième étape de production des LB2 « dépendante de l'Ag » (Banchereau & Rousset, 1992; Li *et al.*, 1996). Selon l'intensité du signal via leurs BCR, le facteur « *B-cell activating factor* » BAFF, les facteurs de transcription et le microenvironnement, les LB arrivant à la rate se différencient soit en LB de la ZM (ayant un signal BCR faible et dépendamment du récepteur NOTCH2 et son ligand Delta like-1) soit en LB folliculaire (B Fo) (Descatoire *et al.*, 2014).

Après avoir reconnu l'Ag par leurs BCR et grâce aux LT, les LB dans le centre germinatif effectuent l'hypermutation somatique qui consiste à introduire des mutations ponctuelles au niveau des régions « *Complementarity determining regions* » CDR pour augmenter l'affinité à l'Ag. Ensuite, selon le type de l'antigène reconnu, des changements dans la région constante de l'Ig s'effectuent par excision des séquences d'ADN dans le but de générer une réponse immunitaire optimale et adaptée à l'Ag. Afin de produire un autre isotype, la commutation de classe s'effectue en remplaçant le locus C $\mu$  codant pour le IgM par un autre locus : C $\delta$  pour IgD, C $\alpha$  pour IgA, C $\gamma$  pour les IgG et C $\epsilon$  pour IgE. Les LB sélectionnés prolifèrent, et se différencient soit en cellules plus grosses sécrétrices d'Ig, les plasmocytes, soit en lymphocytes B mémoires à longue durée de vie (Hoffman *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Les lymphocytes B innés (B1)

Chez l'adulte, les lymphocytes B2 sont reconstitués seulement et constamment, tel que décrit plus haut, à partir des progéniteurs Ig<sup>-</sup>, alors que les B1 sont reconstitués par transfert des cellules matures Ig<sup>+</sup> issus de la cavité péritonéale (Kantor *et al.*, 1992) (Voir les détails dans la **section 1.3**). En effet, les B1 murins provenant des progéniteurs distincts des précurseurs B2 (Tung *et al.*, 2006) ont été décrits pour la première fois en 1983 comme une population minoritaire de cellules B reconnues par le phénotype CD19<sup>+</sup> B220<sup>+/-</sup> IgM<sup>++</sup> CD23<sup>-</sup> (Clarke *et al.*, 2018; Hayakawa *et al.*, 1983). Un sous-ensemble de cette population nommé « les B1a » exprime le marqueur de surface cellulaire CD5 et secrètent spontanément les anticorps naturels, majoritairement de la classe IgM (Baumgarth, 2011). Le récepteur CD5 est une glycoprotéine appartenant à la famille

des récepteurs de type « *scavenger* » qui a été lié uniquement aux lymphocytes T et il est reconnu par son rôle immunomodulateur des signaux générés par les récepteurs cellulaires dans les conditions normales et inflammatoires. En effet, différentes études ont suggéré que CD5 agit comme un inhibiteur de la signalisation médiée par le BCR/TCR, régule la survie des LT, et pourrait même avoir un rôle dans les maladies auto-immunes (Domingues *et al.*, 2016; Soldevila *et al.*, 2011). D'autres études ont montré la présence d'une population minoritaire de LB qui ressemble étroitement aux LB innés, les B1a, en termes de distribution tissulaire, du phénotype, du développement et du fonctionnement mais qui n'expriment pas à leurs surfaces le marqueur CD5. Les B1 murins sont ainsi divisés en deux sous-populations : les « B1a » qui sont CD5<sup>+</sup> et les « B1b » qui sont CD5<sup>-</sup> (Kantor & Herzenberg, 1993; Snow, 2012). Les B1b représentent typiquement 5-10% des B1 totaux et semblent apparaître plus tard que les B1a durant le développement (Herzenberg, 2000).

Contrairement aux B1a qui se développent principalement à partir des progéniteurs fœtaux, les B1b se développent à partir des cellules souches fœtales et adultes (Baumgarth, 2011). Ils ont des fonctions immunitaires distinctes des B1 CD5<sup>+</sup> y compris la reconnaissance d'une plus large gamme d'antigènes conservés, la production des IgM spécifiques de l'antigène (Alugupalli *et al.*, 2004; Baumgarth, 2011) et le développement d'une réponse immunitaire indépendante des cellules T mais qui persiste à long terme (comme dans le cas de *Streptococcus pneumoniae*) (Haas *et al.*, 2005). En outre, il a été constaté qu'en réponse à *Borrelia hermsii* (*B.hermsii*), les souris déficientes en LT, B Fo, LB de ZM ou en B1a, ont réussi à résoudre la bactériémie et sont devenues résistantes à la réinfection. En comparaison avec d'autres types de LB, les chercheurs ont montré que les B Fo ne sont pas nécessaires dans la protection contre de *B.hermsii* et que les LB de la ZM ne sont impliqués que lorsque la charge bactérienne est élevée (Alugupalli *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que, seulement, les cellules B1b s'expandent et fournissent une immunité durable similaire à celle produite par les LB2. Mais contrairement aux LB2, cette immunité est générée et maintenue en absence complète de LT (Alugupalli *et al.*, 2004).

Bien qu'elles constituent environ 5% des cellules B chez l'homme et la souris, les LB1 (B1a et B1b) d'origine fœtal peuplent principalement les cavités péritonéale et pleurale durant la vie adulte où elles constituent 30–60% des lymphocytes totaux dans ces sites (Baumgarth, 2013). Il a été démontré que la chémokine « *CXC chemokine ligand 13* » (CXCL13), sécrétée par les macrophages et les cellules stromales du péritoine, semble être nécessaire pour la résidence des B1 dans ces cavités et aussi dans la production des IgM (Ansel *et al.*, 2002). Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans le recrutement et le maintien des LB1 ne sont pas

complètement explorés (Bröker *et al.*, 2018). Les lymphocytes B1 sont trouvés à faible fréquence dans les ganglions lymphatiques (0,1 à 0,3%), dans la rate, ces cellules constituent à peu près 1-2% des lymphocytes totaux (Parham, 2014), dans la moelle osseuse (0,1 à 0,2%), dans le parenchyme pulmonaire (0,4 à 0,6%) et dans le sang (0,3 à 0,5%). De plus, les LB1 péritonéaux sont à l'origine de presque 40% des cellules B IgA<sup>+</sup> (IgA indépendants de LT) dans la lamina propria intestinale (Berland & Wortis, 2002; Macpherson *et al.*, 2000). En effet, les LB1 (B1a et B1b) ont un phénotype CD19<sup>+</sup> IgM<sup>++</sup> IgD<sup>+/-</sup> CD23<sup>-</sup> B220<sup>+/-</sup>, avec l'expression de Mac-1 ou CD11b chez les B1 péritonéales et non les B1 spléniques (Haas *et al.*, 2005).

Malgré l'identification des sous-types de LB1 murins, la dichotomie des B1 en B1a et B1b, chez l'homme, n'a pas été trouvée jusqu'à présent. Les différences et les similarités entre les B1 murins et humains sont présentées dans le **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1 Tableau comparatif entre les cellules B1 murines et humaines

Tiré de (Mangge *et al.*, 2020)

Caractéristiques	LB1 murins	LB1 humains
Capacité de stimuler la prolifération des LT	Oui	Oui
Signalisation intracellulaire tonique	Oui	Oui
Sécrétion spontanée des IgM	Oui	Oui
Présence dans les cavités pleurale/péritonéale, rate, MO, intestin	Oui	Inconnu
Présence dans le cordon ombilical et le sang périphérique adulte	Non	Oui
Réduction de LB1 avec l'âge	Non	Oui
CD5 récepteur spécifique des B1a	Oui	Non
Identification de B1a et B1b	Oui	Non
Phénotype	CD19+ CD23- B220+/- IgM+	CD19+ CD20+ CD27+ CD43+ CD38- CD70-

### 1.2.3 Ontogénèse des lymphocytes B1

La production des lymphocytes B est initiée lors des tout premiers stades du développement embryonnaire murins. Les cellules endothéliales hémogéniques (CEH) et les cellules hématopoïétiques (CH) y compris les érythrocytes primitifs, les mégacaryocytes et les macrophages fœtaux, sont les premières lignées cellulaires à se différencier dans le sac vitellin à partir des hémangioblastes provenant du mésoderme (Choi, 2002; Frame *et al.*, 2016). Les cellules endothéliales hémogéniques, qui donnent naissance aux progéniteurs érythro-myéloïdes (PEM), et les cellules hématopoïétiques apparaissent au jour embryonnaire 7.5 (E7.5) alors que les macrophages se différencient au jour (E9) (Chen *et al.*, 2011; Plein *et al.*, 2018) (**Figure 1.2**).

Au cours de la formation du sac vitellin définitif, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) dérivées de la région *Aorta-Gonad-Mesonephros* (AGM), migrent au jour (E10.5), vers le foie fœtal, qui devient ensuite le site d'hématopoïèse fœtal (Choi, 2002; Gordon-Keylock *et al.*, 2013; Plein *et al.*, 2018). Ce dernier et après sa colonisation par les CSH, constitue un site important de production des cellules B. Finalement, ces CSH migrent vers la MO où ils maintiennent l'hématopoïèse, y compris la production des lymphocytes B.

Bien que le développement des lymphocytes B à partir des CSH au niveau de la MO postnatale sont bien définies, l'origine spatio-temporel des différents sous-populations de LB a été longuement débattu, mais plus particulièrement celui des lymphocytes B1 reste encore un sujet controversé (Ghosh *et al.*, 2012). Étant donné que les précurseurs B1 existent dans différents tissus embryonnaires, y compris le sac vitellin, la splanchnopleure para-aortique, le foie fœtal et la moelle osseuse néonatale, la production des cellules B1 se fait à plusieurs vagues et à des différents moments d'ontogenèse (Montecino-Rodriguez & Dorshkind, 2012). En effet, il a été démontré que, chez les souris receveuses après transplantation des cellules progénitrices de différents stades, seulement les cellules progénitrices isolées du foie fœtal au jour E16 ont été capables de reconstituer les lymphocytes B1a CD5<sup>+</sup> mais n'ont pas réussi à donner des cellules B2 conventionnelles. Tandis que, les cellules progénitrices pro-B isolées de la moelle osseuse adulte sont parvenues à produire efficacement les cellules B2 mais pas la population B1 (Godin *et al.*, 1995; Hardy & Hayakawa, 1991). Les études ont suggéré, également, l'émergence des précurseurs lymphoïdes, durant la période embryonnaire, qui contribuent à des types lymphocytaires uniques, comme les cellules B1a CD5<sup>+</sup> et les cellules T $\gamma\delta$  (Cumano *et al.*, 1993; Godin *et al.*, 1993). Ceci démontre l'existence d'une lymphopoïèse B indépendante des CSH (Kobayashi *et al.*, 2014; Yoshimoto *et al.*, 2011). En fait, la première vague se fait à partir des cellules précurseurs dérivées dans le sac vitellin avant et indépendamment du développement des CSH (Ghosh *et al.*, 2016). La deuxième vague de développement des B1 est ensuite produite des précurseurs du foie fœtal dérivés de l'AGM (Godin *et al.*, 1993). Finalement, et après la perte de l'activité hématopoïétique du foie fœtal, la dernière vague de production des cellules B1 s'effectue durant la période néonatale, à partir des précurseurs B1 qui se trouvent dans la moelle osseuse et y persistent à l'âge adulte. Néanmoins, l'origine fœtal exacte de ces précurseurs B1 n'est pas encore connu et leur potentiel de production de LB1 reste encore limité (Barber *et al.*, 2011; Baumgarth, 2017). Par contre, la moelle osseuse devient le site principal de génération et de maturation des Lymphocytes B2 à partir des CSH durant toute la vie adulte (Yzaguirre & Speck, 2016).

En conclusion, les informations trouvées à date ne peuvent pas déterminer si l'origine fœtal précoce de la sous-population B1a sont des cellules souches (inconnues) provenant de la partie intra-embryonnaire et extra-embryonnaire (mais quasiment absentes dans les moelles osseuses néonatales et adultes), ou bien si les cellules B1a sont formées directement de la différenciation des progéniteurs B1 fœtal indépendamment des CSH, via une voie inconnue (peuvent-être les progéniteurs PEM ou d'autres progéniteurs dérivés de l'hémangioblaste ou l'endothélium hématogène) (Ghosn & Yang, 2015).



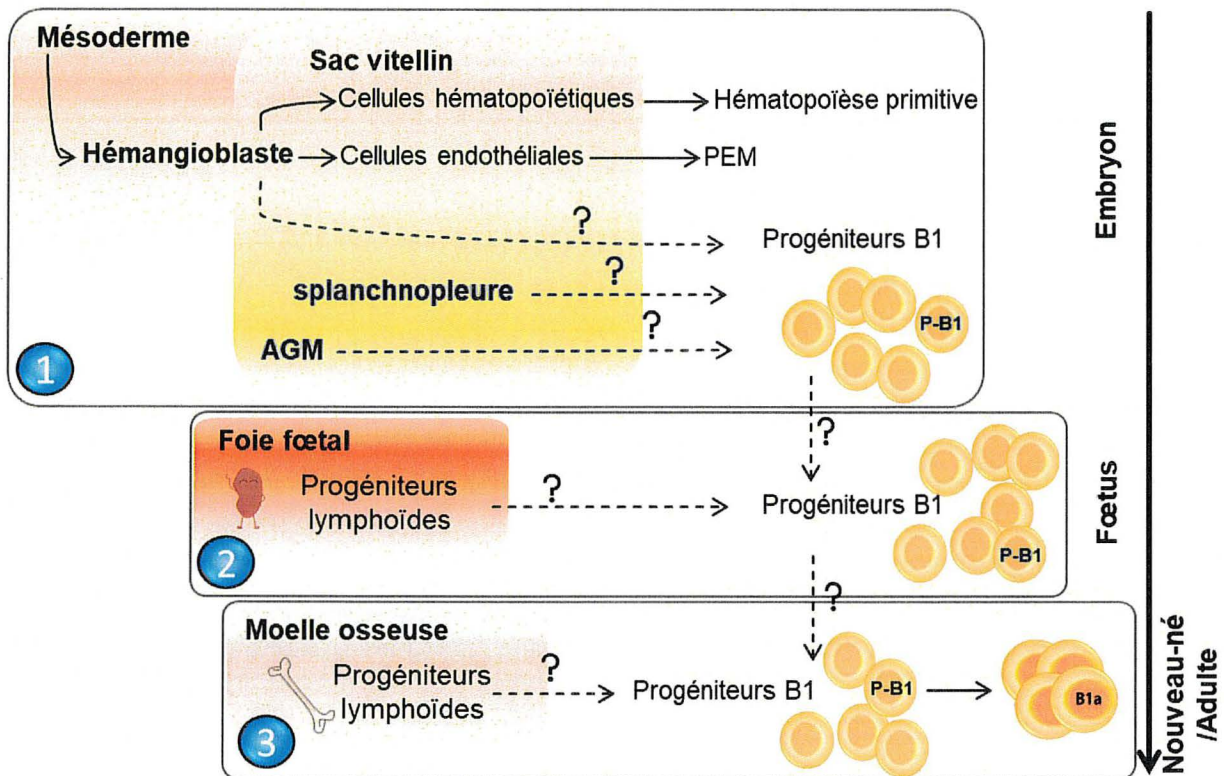


Figure 1.2 Modèle proposé des vagues principales de développement des cellules B1a

Durant l'embryogenèse, l'hémangioblaste dérivant du mésoderme donne naissance aux cellules hématopoïétiques (responsable de l'hématopoïèse primitive) et aux cellules endothéliales. Les progéniteurs érythro-myéloïdes (PEM) peuvent donner aussi des érythroblastes embryonnaires. Le développement des B1a se fait en trois vagues principales. La première vague (1) s'initie dans le sac vitellin et dans la splanchnopleure avant l'émergence de cellules souches hématopoïétiques définitives (HSC). La ligne pointillée traduit le fait que l'origine exacte des progéniteurs B1 n'est pas encore claire et certaine. Il a été montré que les progéniteurs B1 existent également dans la région de l'Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) et ils migrent ensuite vers le foie fœtal. Ainsi, la deuxième vague de développement de LB1 (2) s'effectue dans le foie fœtal. Il n'est pas encore clair aussi si ces progéniteurs B1 dérivent des progéniteurs lymphoïdes ou bien ce sont les cellules de l'AGM qui ont colonisé le foie fœtal. Après la naissance et durant la vie adulte, le foie fœtal perd son activité hématopoïétique et les progéniteurs B1 résident dans la moelle osseuse, l'organe principale de la lymphopoïèse B. C'est à ce niveau que la troisième vague (3) s'effectue, où les progéniteurs B1 s'expandent et forment les cellules B1a matures qui se rendent sous l'effet de CXCL-13, principalement, vers la cavité péritonéale/Pleurale. Compilée et inspirée d'après (Choi, 2002; Ghosn & Yang, 2015; Hadland *et al.*, 2017; Montecino-Rodriguez & Dorshkind, 2012).

### 1.3 Les lymphocytes B1a

Comme il a été mentionné dans la section précédente, les B1a faisant parties des lymphocytes B1 proviennent principalement du foie fœtal et se maintiennent tout au long de la vie adulte, par auto-renouvellement via des mécanismes inconnus. En fait, des études sur les souris ont montré que la transplantation des précurseurs de LB purifiés issus du foie fœtal à une souris adulte, contribue au développement des cellules B1a. En revanche, l'absence de l'établissement

de population B1a a été remarquée chez des souris receveuses des précurseurs conventionnels purifiés de la moelle osseuse adulte. Plus encore, des expériences de transplantation ont indiqué qu'une population CD45R(B220)<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> comprend les progéniteurs biaisés vers la lignée cellulaire B1 (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2006). Ceci confirme ainsi, le concept d'une origine embryonnaire de B1a distincte des lymphocytes B2 conventionnels (Ghosn *et al.*, 2012; Montecino-Rodriguez & Dorshkind, 2012).

A l'instar de l'homme, les souris sont nées avec un niveau significatif d'anticorps IgM poly-réactifs, à faible affinité qui sont largement connus d'être générés par les cellules B néonatales « innées », en absence de toute stimulation antigénique (Klinker & Lundy, 2012; Revillard, 2001). Ces anticorps désignés par « naturels » diffèrent de ceux produits par les LB2 dans les organes lymphoïdes secondaires par l'absence de l'hyper-mutation somatique et de l'ajout des nucléotides due à l'absence de l'enzyme TdT « *terminal desoxynucleotidyl transférase* » durant la période fœtale/néonatale (Griffin *et al.*, 2011). Dans ce dernier cas, les LB tendent à se différencier en B1 alors qu'en présence de TdT au niveau de la moelle osseuse adulte, les LB se différencient et demeurent sous la forme B2 conventionnelle (Baumgarth *et al.*, 2000). Il a été estimé que 80 à 90% des IgM sériques sont produits spontanément et constamment par des B1a dans les conditions homéostatiques (Rothstein *et al.*, 2013) ainsi qu'une grande partie des IgA intestinaux naturels dépendamment de l'Interleukine-5 (Macpherson *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2004a). La production des IgA spécifiques des composants antigéniques communs de la microflore joue un rôle régulateur dans le maintien du microbiote gastro-intestinal local (Macpherson & Slack, 2007). Un défaut dans la production de ces anticorps naturels, peut engendrer une augmentation de sensibilité aux infections microbiennes (Mamidi *et al.*, 2017).

En dépit que les cellules B1a murines sont bien identifiées, les LB1 humains ne le sont pas. Le marqueur CD5 spécifique des lymphocytes B1a murins n'est pas considéré comme discriminatoire chez l'homme, étant donné qu'il est exprimé sur les lymphocytes T et sur les lymphocytes B pré-naïfs, LB activés, immatures/transitionnels dans le sang, la moelle osseuse et la rate (Bouaziz *et al.*, 2014; Descatoire *et al.*, 2011).

Bien qu'il soit connu que les LB de la ZM ont les mêmes précurseurs des cellules B FO mais différents des progéniteurs B1 et que la localisation des B1 matures et les LB ZM est différente, les LB1 murins et LB de la ZM partagent de nombreuses similitudes fonctionnelles. En effet, ces cellules de l'immunité innée secrètent des IgM naturels indépendamment de LT, ont un répertoire des anticorps limité qui reconnaît les auto-antigènes et les motifs bactériens communs (Zouali & Richard, 2011). Vu les données insuffisantes sur les B1 humains et les similitudes entre les B1

et les LB ZM CD27<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>, il se pourrait qu'une seule population de cellules B innées existe chez l'homme (Bemark, 2015).

En 2011, Griffin et ses collaborateurs ont démontré la présence d'une population qui partagent les mêmes caractéristiques fonctionnelles avec les B1 murins voire la sécrétion spontanée d'IgM, la stimulation efficace des cellules T et la signalisation intracellulaire tonique (Griffin *et al.*, 2011). En 2016, Quach *et al.*, ont attribué le phénotype CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD70<sup>-</sup> aux LB1 humains et ont confirmé leur distinction des LB2 (Quách *et al.*, 2016). Les études sur les B1 humains ont été réalisées principalement au niveau du sang périphérique et vu la difficulté de collecter des ascites des individus sains, il n'est pas encore connu si les B1 humains résident principalement dans la cavité péritonéale (Kageyama & Katayama, 2019). Ces cellules B1 se trouvent dans le cordon ombilical et dans le sang périphérique humain des adultes avec une fréquence de 1% des LB totaux. Contrairement aux souris, où la fréquence des B1 augmente ou reste inchangeable avec l'âge, la fréquence des LB1 humains CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD70<sup>-</sup> ainsi que leur capacité à sécréter spontanément des IgM sont réduites avec l'âge (Quách *et al.*, 2016). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de sensibilité des personnes âgées aux maladies (Perez-Andres *et al.*, 2011). Des questions sur la fréquence et l'ontogénie des lymphocytes B1 humains (s'ils proviennent des progéniteurs communs avec des cellules B2, les CSH, ou bien ils dérivent des progéniteurs spécifiques aux cellules B1) demeurent encore sans réponses à cause des difficultés dans l'utilisation des essais de transplantation (Kageyama & Katayama, 2019).

Étant donné la relation que les B1 humains possèdent avec la survenue de différentes pathologies (tels que les maladies neurodégénératives, auto-immunes (Rothstein *et al.*, 2013) et le lupus érythémateux systémique (Griffin & Rothstein, 2011)), l'identification des LB1 humains s'avère importante afin d'étudier leurs rôles et de développer des thérapies.

Les lymphocytes B1 n'effectuent pas une expansion clonale suite à la stimulation par BCR, probablement, en raison de l'expression d'un co-récepteur inhibiteur. Néanmoins, ils répondent rapidement aux pathogènes non spécifiques via leurs PRR et à un signal inflammatoire. Cette reconnaissance permet leur migration vers les tissus lymphoïdes secondaires, où ils se différencient rapidement en cellules sécrétant des anticorps (Morris *et al.*, 2019).

### 1.3.1 Phénotype des B1a

Les cellules B1 murines sont plus larges par rapport aux cellules B2 et sont définies grâce aux différents marqueurs existants à leurs surfaces. Les B1a sont CD5<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> B220(CD45)<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> CD9<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> (Clone S7) contrairement aux B2 qui sont CD23<sup>+</sup> B220(CD45)<sup>+</sup> IgM<sup>+/-</sup> IgD<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup> (Clone S7) (CD43 Clone S7 est marqueur spécifique des LB1 et des progéniteurs B mais il est absent chez les LB2 matures) (Duan & Morel, 2006; Wortis & Berland, 2001) (**Figure 1.1**). Ainsi que la différence phénotypique, les lymphocytes B1 diffèrent des LB2 au niveau de différentes autres caractéristiques (**Tableau 1.2**).

**Tableau 1.2** Tableau comparatif entre les cellules B1 innées et les B2 conventionnelles

Caractéristiques	B1	B2
Origine	Auto-renouvellement B1 (Foie Fœtal)	Cellules souches hématopoïétiques (Moelle Osseuse)
Principaux sites	Cavité péritonéale/Pleurale	Organes lymphoïdes secondaires (Rate et ganglions lymphatiques)
Sécrétion des Anticorps	IgM naturels	Isotypes (IgA, IgD, IgG, IgE et IgM)
Aide des cellules T	Non	Oui
Développement dans le centre germinatif	Non	Oui
Hypermutation somatique	Non	Oui
Diversité de la région V	Diversité réduite	Hautement diverse

### 1.3.2 Rôle physiologique des lymphocytes B1a

Les cellules effectrices de l'immunité innée, les lymphocytes B1a, sont connus en tant que producteurs majeurs des anticorps naturels de type IgM en absence de toute immunisation. Contrairement aux cellules B2 conventionnelles, le répertoire de récepteurs que possèdent les cellules B1a est biaisé majoritairement vers des composants bactériens et des auto-antigènes, expliquant ainsi leurs rôles cruciaux dans la suppression des cellules apoptotiques (en se liant aux phospholipides altérés exprimés à la surface des cellules subissant l'apoptose), des débris cellulaires (dépendamment du complément), dans l'élimination efficace du pathogène et la facilité de transition d'une réponse immunitaire innée à adaptative (Hardy & Hayakawa, 2015; Martin &

Kearney, 2001). Tous ces mécanismes permettent de renforcer le système immunitaire inné et la protection de l'hôte contre les pathogènes tout en maintenant une tolérance immunologique envers soi-même (Kaveri *et al.*, 2012). Une étude a démontré qu'une augmentation de sensibilité à l'infection par Influenza et aussi de mortalité ont été observées dans des souris déficientes en anticorps naturels (Baumgarth *et al.*, 2000).

Quoique les B1a possèdent des rôles potentiels dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, et dans la protection contre les virus, les bactéries et les parasites (Baumgarth, 2011), des études ont mis en évidence aussi leur participation dans le développement de certaines pathologies auto-immunes (Duan & Morel, 2006). Par ailleurs, afin d'empêcher l'activation inappropriée des B1a, la molécule CD5 fonctionne comme un régulateur négatif de la signalisation BCR (Berland & Wortis, 2002). Mais, les voies métaboliques qui soutiennent les différentes fonctions des lymphocytes B1 CD5<sup>+</sup> restent encore inconnues.

- **L'auto-immunité**

Les anticorps naturels à faible spécificité produits par les cellules B1a peuvent reconnaître les antigènes du soi, ces cellules ont été donc associées à des maladies auto-immunes dans des modèles murins et humains (Merino & Gruppi, 2006) dont la polyarthrite rhumatoïde (Hassan *et al.*, 1996), le syndrome de Sjögren (Dauphinee *et al.*, 1988), le syndrome antiphospholipide primaire et le lupus systémique (Zhong *et al.*, 2009).

Il a été montré que les souris déficientes en cellules B1 péritonéales présentent un lupus moins sévère par rapport aux souris sauvages (Murakami *et al.*, 1995). Ces auto-anticorps ne pourraient pas être la seule source de pathogénicité des B1a puisqu'ils existent même dans des conditions normales. Ainsi, d'autres mécanismes ont été associés aux B1a expliquant leur implication dans l'auto-immunité, inclusivement, la présentation des antigènes du soi aux lymphocytes T auto-réactifs et la capacité de sécréter des cytokines comme l'interleukine-10 (IL-10) (Duan & Morel, 2006; O'garra *et al.*, 1992). Dans certains modèles murins de maladies auto-immunes y compris le BWF1 (un modèle murin de lupus érythémateux systémique), le niveau des B1 est élevé dans la cavité péritonéale et dans la rate. Par ailleurs, la suppression de ces lymphocytes réduit la sévérité de lupus néphrétique causé par la maladie systémique (Ishikawa, 2005). En revanche, de nombreux modèles ont montré que la population B1a n'est pas la cause principale des maladies auto-immunes et leur présence n'est pas cruciale pour la pathogenèse auto-immune.

- **La leucémie lymphoïde chronique (LLC)**

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) représente 25 à 30% de tous les types de leucémie mais elle est la forme la plus répandue en Europe et en Amérique du nord (Ghia *et al.*, 2007). Cette maladie lymphoproliférative a une faible incidence chez les jeunes mais elle évolue lentement dans l'organisme et survient plus fréquemment chez les adultes âgés de plus de 50 ans (Foon *et al.*, 1990). Il a été démontré que la LLC est caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B monoclonaux qui expriment le marqueur CD5 à leurs surfaces cellulaires et ayant des récepteurs BCR auto-réactifs (Boumsell *et al.*, 1978; Hallek, 2019). Le fait que ces cellules défectueuses, ayant l'apparence normale, continuent à se multiplier en dépassant leur durée de vie normale (via l'expression du gène *Bcl-2* d'où leur résistance à l'apoptose) (Hamblin *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2015), elles finissent par s'accumuler dans le sang, dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires (Siegel *et al.*, 2020; Society, 2020). Malgré les ressemblances biologiques et immuno-phénotypiques des cellules CLL avec les cellules B1a murines (Darwiche *et al.*, 2018), qui sont connues comme l'origine cellulaire du développement de la LLC dans des modèles murins, la question sur le type exact des lymphocytes B causant la LLC humaine demeure floue (Kikushige, 2019).

- **La septicémie**

En plus de sécréter des anticorps naturels à l'état d'équilibre, les lymphocytes B1a répondent à une variété d'agents pathogènes, à savoir les bactéries, les virus, les champignons et les parasites par l'induction d'une production importante des IgM naturels (Boes *et al.*, 1998; Subramaniam *et al.*, 2010). Dans un modèle de septicémie animale, il a été montré que la reconstitution du système immunitaire adaptatif par un transfert adoptif des LB et LT WT dans des souris « *Recombination-activating genes 1* » Rag1 KO (déficientes en LT et en LB matures) a rétabli leur résistance à l'infection bactérienne et a amélioré leur survie (Shelley *et al.*, 2003). Ainsi que le rôle important de l'immunité adaptative dans la septicémie, les études scientifiques ont démontré un rôle essentiel des cellules B1a au sein de ce syndrome (Honda *et al.*, 2016; Kelly-Scumpia *et al.*, 2011). La septicémie est une maladie grave voire mortelle, affectant ~19 millions d'individus par an dans le monde (Van Wyngene *et al.*, 2018). Afin d'éliminer le pathogène, le système immunitaire activé en réponse à une infection, entraîne une réponse innée aberrante causant une réaction pro-inflammatoire excessive suivi par une activation des mécanismes anti-inflammatoire et immunosuppresseurs (Singer *et al.*, 2016). La septicémie est une réponse systémique générale qui affecte tout l'organisme au lieu qu'elle soit locale. Elle induit une réponse inadaptée de l'hôte caractérisée par des changements profonds au niveau de l'homéostasie métabolique causant un choc septique, qui se traduit par une défaillance

circulatoire aiguë et un dysfonctionnement des organes (Wentowski *et al.*, 2019), d'où la mort. Le transfert adoptif des cellules B1a dans des souris atteintes de septicémie a considérablement atténué la réaction immunitaire excessive et a amélioré la survie des souris malades. Par ailleurs, les souris CD19<sup>-/-</sup> déficientes en LB y compris les B1a ont montré une sensibilité accrue à l'infection bactérienne d'où une augmentation de mortalité (Aziz *et al.*, 2017). Les auteurs ont révélé que les B1a après leur activation, quittent la cavité péritonéale et migrent vers l'organe lymphoïde secondaire comme la rate où ils jouent un double rôle dans le cas de septicémie (Morris *et al.*, 2019). Elles contrôlent l'inflammation induite par l'infection via la sécrétion des cytokines y compris l'IL-10 (une interleukine immuno-modulatoire induite par la voie de signalisation de TLR4 qui contrôle le développement de l'inflammation), le facteur stimulateur des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (renforce la production des IgM naturels ciblant le pathogène) et l'IL-3 (Aziz *et al.*, 2017). Cette dernière (l'IL-3) confère à la sous-population de B1a qui le secrète un potentiel pathologique puisqu'il promeut le développement d'un choc cytokinique, connu comme la cause d'une forte réponse inflammatoire, et le dysfonctionnement des organes qui en résulte (Fitzpatrick, 2019). Les étapes d'activation et la provenance de ces cytokines seront plus détaillées dans la section suivante. Malgré les énormes efforts pendant ces dernières années, il n'existe aucune thérapie spécifique efficace pour la septicémie (Weis *et al.*, 2017).

### 1.3.3 Les cellules activatrices de la réponse innée (IRA)

Les lymphocytes B1 permettent à l'organisme de déclencher rapidement la réponse immunitaire innée contre les différents pathogènes comme les infections bactériennes et virales incluant l'influenza (Choi & Baumgarth 2008). Des études dans un modèle de septicémie abdominale ont démontré que les B1a donnent naissance à une population de cellules B IgM<sup>+</sup> qui produit le GM-CSF. Ces cellules ont été détectées dans la rate 4 jours post-stimulation par LPS avec une fréquence de 1 à 4% des cellules B dans cet organe. Les cellules B1a constituant la population sécrétrice de GM-CSF ont été nommées comme « **les cellules activatrices de la réponse innée** » (IRA). Ces cellules expriment à leurs surfaces les marqueurs CD19, B220, IgM, CD5, CD43, CD93, CD138, VLA-4 (*very late antigen-4*), LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) (Chousterman & Swirski, 2015; Rauch *et al.*, 2012).

Les cellules IRA dérivent des lymphocytes B1a, mais elles en diffèrent en termes de sécrétion de GM-CSF et IL-3 connus comme modulateur de la myélopoïèse d'urgence (Weber *et al.*, 2015). En effet, comme illustré dans la **Figure 1.3**, en réponse aux pathogènes, par exemple, les LPS

des bactéries Gram négatives, les B1a s'activent par la voie de signalisation dépendante de TLR4/Myd88, se mobilisent et migrent de leurs localisations anatomiques primaires, les cavités péritonéales et pleurales, vers les organes lymphoïdes secondaires telle que la pulpe rouge de la rate où ils se différencient en cellules plus grosses (IRA) productrices des anticorps naturels de type IgM et des cytokines (Weber *et al.*, 2014). Le GM-CSF et IL-3 appartiennent à la famille des cytokines de chaînes communes  $\beta$  (chaîne  $\beta$ / CD131), qui présentent des fonctions pléiotropes, à savoir la régulation de la croissance, de la différenciation et de l'activation des cellules myéloïdes. Le GM-CSF peut être sécrété par différents types cellulaires, tandis que l'IL-3 a été connue comme un produit principal des cellules T (Chin *et al.*, 2019). Le GM-CSF sécrété par les IRA en cas de septicémie, sera utilisé d'une manière autocrine pour induire une production plus importante des anticorps naturels IgM, facilitant ainsi la reconnaissance du pathogène par les cellules phagocytaires (Chousterman & Swirski, 2015; Morris *et al.*, 2019). Néanmoins, l'IL-3 induit une production élevée des neutrophiles résultant un choc cytokinique qui provoque à son tour un état d'inflammation systémique (Weber *et al.*, 2015).

Bien que la surexpression de GM-CSF a été reliée aux différentes maladies humaines y compris l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et la leucémie myélo-monocytaire (Dhagat *et al.*, 2018), des études expérimentales sur des modèles murins de septicémie ont montré le rôle bénéfique de GM-CSF dans l'amélioration de survie des souris par l'atténuation de la réponse inflammatoire excessive et par l'induction d'une meilleure suppression de l'agent pathogène (Borriello *et al.*, 2019). D'ailleurs, il a été démontré que la suppression spécifique de l'activité des cellules B IRA chez des souris, a altéré l'élimination des bactéries. En conséquence, cette altération a été associée à une sécrétion incontrôlée des cytokines engendrant ainsi un choc septique et la mort rapide de ces souris (Rauch *et al.*, 2012).

Autrement dit, les cellules IRA provenant des cellules B1a différenciées suite à une infection, peuvent jouer un rôle à double faces. Elles protègent l'organisme contre la septicémie grâce à la sécrétion de GM-CSF et aux anticorps IgM mais d'autre part elles peuvent aggraver la situation par la production de l'IL-3. Toutefois, bien que la protéine Fzd6 hautement exprimée chez les B1a est un composant des voies de signalisation Wnt/Fzd, rien n'est encore connu sur les mécanismes impliqués dans l'activation, la migration et la sécrétion de ces cytokines spécifiquement chez les IRA provenant des B1a. Ces cellules ont été identifiés aussi chez l'homme. Partant de ce fait, une meilleure compréhension des mécanismes utilisés par ces cellules pour faire la balance de sécrétion de ces cytokines s'avère importante et sera utile à des fins thérapeutiques.



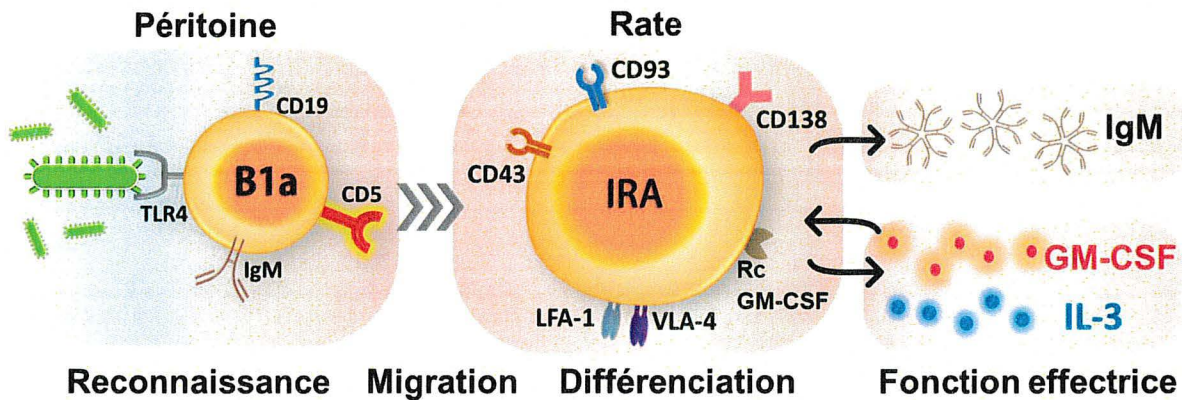


Figure 1.3 L'origine et la fonction des cellules B activatrices de la réponse innée (IRA)

La reconnaissance des composants bactériens, les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-, par les cellules B1a hébergeant la cavité péritonéale via leurs récepteurs TLR4, permet leur activation et leur migration vers la rate. A ce niveau, les cellules B1a se différencient en IRA, cellules plus grosses sécrétrices des IgM et des cytokines, l'IL-3 causant un choc cytokinique et le facteur de stimulation des colonies de Granulocytes/Macrophages (GM-CSF) qui sera réutilisé d'une manière autocrine pour induire la sécrétion des IgM naturels. Inspirée de (Weber *et al.*, 2014).

#### 1.4 Les voies de signalisation Wnt/Fzd

La famille des gènes *frizzled* (phénotype *Dfz*) a été identifiée pour la première fois lors de l'étude des mutations affectant la polarité des poils de la cuticule chez la *drosophile* adulte, *Drosophila melanogaster* (Gubb & Garcia-Bellido, 1982) (Les détails sur le récepteur Frizzled (Fzd) sont dans la section suivante). Les mutations au niveau du gène *frizzled* (*Dfz*) montrent un phénotype de polarité tissulaire avec une mauvais orientation des poils cuticulaires et des ailes qui, normalement, présentent une orientation précise par rapport aux axes corporels (Adler *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996). C'est dans l'année 1989 que les chercheurs ont isolé le gène *Drosophila fz* (Vinson *et al.*, 1989) et dans les années suivantes, les homologues Frizzled chez les mammifères ont été identifiés (Chan *et al.*, 1992; Koike *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2016). Les Fzd sont au nombre de 10 isoformes, chez l'humain et la souris, où chacun est codé par un gène distinct (Corda & Sala, 2017). En effet, les récepteurs de la famille Fzd partagent une structure commune composé d'une partie N-terminale extracellulaire comportant un domaine riche en cystéines (CRD), le site primaire de liaison aux différentes protéines secrétées, y compris essentiellement, les lipoglycoprotéines de la famille (Wnt) (Schulte, 2010; Tokuhara *et al.*, 1998). Cette région est suivie de sept segments hydrophobes, trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires, et une partie C-terminale intracellulaire, possédant le motif interne (Postsynaptic density 95 [PSD-95]; Discs large [Dlg]; Zonula occludens-1 [ZO-1]) PDZ (KTxxxW). Ce motif est crucial pour son interaction avec la phosphoprotéine Dishevelled (DVL), activant

ainsi la transduction du signal intracellulaire (Schulte & Bryja, 2007). La queue carboxy-terminale n'est pas bien conservée chez les Frizzleds (Huang & Klein, 2004). En fait, le motif de liaison « Ser/Thr-Xxx-Val » pour des protéines à domaine PDZ, n'est observé que chez Frizzled1, 2, 4, 5, 7, 8, et 10, mais il est absent chez Frizzled3, 6, et 9 (Wang *et al.*, 2006a) (**Figure 1.5**). Cette structure de sept domaines transmembranaires ressemble aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) mais l'Union internationale de pharmacologie (IUPHAR) les a classés séparément et a attribué à cette famille distincte de GPCR, le nom « la classe Frizzled » (Foord *et al.*, 2005).

Les protéines Frizzled (Fzd) localisées à la surface des cellules, jouent le rôle des récepteurs assurant la transduction des signaux cellulaires via la voie de signalisation Wingless/Int-1 (Wnt) (Schulte & Bryja, 2007). Et comme mentionné précédemment, les protéines Wnt secrétées servent comme ligands pour cette classe de récepteurs Fzd. En effet, le premier Wnt identifié est le proto-oncogène de vertébré *int-1* (pour MMTV *mouse mammary tumor virus integration site*) (*Wnt-1*). Il a été rapporté que ce gène a son orthologue chez la drosophile, le gène *wingless* (*wg*), qui correspond à l'un des premiers « gènes de polarité du segment » identifiés (Nusse *et al.*, 1984; Oliva *et al.*, 2013; Rijsewijk *et al.*, 1987). Chez les mammifères, 19 membres de la famille Wnt ont été dénombrés (Nusse & Clevers, 2017). La diversité des liaisons possibles entre les 19 ligands Wnt et les 10 membres Fzd, fait de la voie de signalisation Wnt un système intrinsèquement compliqué à étudier (Corda & Sala, 2017).

Les approches génétiques tout en étudiant des mutations ciblées ont révélé l'implication des protéines Fzd/Wnt dans plusieurs processus biologiques. Ces processus contrôlent différentes fonctions cellulaires, à savoir le développement embryonnaire, la formation des synapses neurologiques, la prolifération cellulaire, la motilité, la polarité, le maintien des cellules souches, la différenciation tissulaire (Huang & Klein, 2004; van Amerongen & Nusse, 2009) et le maintien de l'homéostasie des tissus adultes qui s'autorenouvellent (Døsen *et al.*, 2006; Girardi & Le Grand, 2018; Yang *et al.*, 2016).

La variété de réponses intracellulaires est régulée principalement par différentes voies de signalisation intracellulaires : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine canonique, et les voies non-canoniques : la voie Wnt/PCP « *Planar cell polarity* » et la voie calcique Wnt/calcium (Strutt *et al.*, 2012) (**Figure 1.4**).

#### 1.4.1 La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie signalétique la plus étudiée, est celle dépendante de  $\beta$ -caténine, un cofacteur de transcription dans la voie Wnt, ayant comme but le control du niveau cytosolique de  $\beta$ -caténine. Cette voie canonique est conservée du drosophile aux vertébrés (Umbhauer *et al.*, 2000).

En absence de ligands Wnt, la  $\beta$ -caténine intracellulaire est recrutée dans le complexe multiprotéique de destruction, formé de Axin, « adenomatous polyposis coli » (APC), caséine kinase 1 (CK1) et glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (Liu *et al.*, 2002). Ces deux dernières kinases effectuent, conséquemment, la phosphorylation de  $\beta$ -caténine engendrant son ubiquitination et, constamment, sa dégradation par le protéasome afin de la garder avec un taux cytosolique très bas (Lai *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2004b; Tolwinski & Wieschaus, 2004).

En cas de fixation de ligands Wnt sur les récepteurs Fzd et son corécepteur transmembranaire « LDL receptor-related proteins 5 and 6 » (LRP5/6), un signal sera transduit pour activer la phosphoprotéine cytoplasmique « Dishevelled » (DVL) qui sera recrutée au niveau de la membrane (Pinson *et al.*, 2000). L'interaction d'Axin avec DVL ainsi que LRP5/6 avec GSK3 $\beta$  engendre le recrutement du complexe Axin/GSK3 $\beta$  à la membrane et, ensuite, la phosphorylation séquentielle de LRP5/6 par GSK3 $\beta$  et par CK1 déjà ancré dans la membrane (Piao *et al.*, 2008). Ceci contribue davantage à l'association du complexe Axin aux récepteurs membranaires, d'où l'inhibition de la phosphorylation de  $\beta$ -caténine médiée par le complexe de dégradation (MacDonald *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2005). L'inhibition de dégradation de  $\beta$ -caténine entraîne ainsi son accumulation, sa stabilisation dans le cytoplasme et sa translocation vers le noyau pour former un complexe avec les facteurs de transcriptions de la famille TCF (facteur des cellules T) /LEF (facteurs de liaison aux activateurs de lymphocytes). En conséquence, la liaison de ces molécules à l'ADN active la transcription des gènes cibles de TCF/LEF (Bienz & Clevers, 2003; Tolwinski & Wieschaus, 2004).

Cette voie impliquant les protéines de la famille Wnt est associée à la carcinogénèse chez l'homme. Les mutations qui permettent la stabilisation de  $\beta$ -caténine ont été identifiés dans les mélanomes et les cancers colorectaux (Morin *et al.*, 1997; Rubinfeld *et al.*, 1997; Umbhauer *et al.*, 2000).

#### 1.4.2 La voie non canonique Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$

La transduction des signaux dans les voies non canoniques repose sur d'autres effecteurs intracellulaires indépendamment de  $\beta$ -caténine. Une voie entraînant la libération de calcium

intracellulaire, qui sert comme un second messager dans la cellule, est désignée par la voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> (Kühl *et al.*, 2000). Cette voie s'avère importante dans différents processus chez les vertébrés, principalement, lors de l'embryogenèse, la morphogenèse, l'organogenèse, la spécification du destin cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine (Slusarski & Pelegri, 2007).

Les études ont montré que certaines interactions Wnt/Fzd, exemple rat Frizzled-2 (RFz-2) (Slusarski *et al.*, 1997) et les ligands Wnt5a et Wnt11 (Westfall *et al.*, 2003), initient une voie de signalisation classique couplée aux protéines G. Où le recrutement des protéines G hétéromériques induit l'hydrolyse de phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et la production de diacylglycérol (DAG) via la phospholipase C (PLC) activée (Kohn & Moon, 2005). D'où, un gradient de Ca<sup>2+</sup> se crée et engendre l'accumulation des ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme à travers les canaux d'échange ionique et les récepteurs localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), tels que les récepteurs IP3 (IP3Rs) et les récepteurs ryanodine (RyRs) (Kohn & Moon, 2005). Ceci permet d'activer des enzymes sensibles au calcium, notamment la protéine kinase II dépendante de calmoduline (CamKII), la protéine kinase C (PKC) (Sheldahl *et al.*, 1999) ainsi que la protéine phosphatase, la calcineurine (Kühl, 2004). Les protéines G et DVL sont impliquées dans la médiation de la transduction du signal par cette voie Wnt (Kühl *et al.*, 2000). Ces enzymes régulent l'expression des gènes cibles via le facteur de transcription « *Nuclear factor of activated T-cells* » NF-AT (Inestrosa & Varela-Nallar, 2014). De plus, la PKC pourrait activer aussi la petite GTPase de la famille Rho « *cell division cycle 42* » la cdc42 qui est connue comme un régulateur de l'organisation du cytosquelette, la prolifération, la motilité et la polarité cellulaire (Schlessinger *et al.*, 2009; Sinha & Yang, 2008; Staal *et al.*, 2008).

#### **1.4.3 La voie non canonique Wnt/JNK ou la voie « Planar cell polarity » PCP**

Outre que la voie calcique, une autre cascade de signalisation non canonique nommée la voie « *Planar cell polarity* » PCP est activée en aval des récepteurs Wnt. Cette voie joue, également, un rôle important dans le maintien et la réorganisation du cytosquelette (Inestrosa & Varela-Nallar, 2014; Mezzacappa *et al.*, 2012) via l'activation de la cascade c-Jun-N-terminal kinase (JNK), d'où son deuxième nom, la voie Wnt/JNK (Varela-Nallar *et al.*, 2012). Cette voie a été élucidée premièrement chez la drosophile comme un régulateur de la polarité tissulaire contrôlant l'orientation des poils sur la cuticule adulte, des ommatidies dans l'œil. En addition, la voie PCP contrôle l'orientation des divisions cellulaires et l'organisation d'autres

structures polaires asymétriques. Plus encore, d'autres processus sont régulés par cette voie tels que l'orientation des follicules pileux dans l'oreille interne et ceux du corps, la fermeture du tube neural, la migration cellulaire et l'extension convergente durant les processus du développement chez les vertébrés (Inestrosa & Varela-Nallar, 2013).

En effet, lors de son activation, la liaison du ligand Wnt à son récepteur Fzd, induit l'activation de DVL suivit par l'activation de petites GTPases, dont *Ras homolog gene family member* (Rho) et *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) (Fanto *et al.*, 2000). Ensuite, Rho et Rac transmettent l'information à leurs effecteurs tout en activant à leurs tours, respectivement, la protéine Kinase associée à RHO (ROCK) et la protéine kinase JNK. Ces kinases induisent une cascade de phosphorylation, ayant pour but la régulation de la survie cellulaire, l'organisation du cytosquelette et/ou l'activation des gènes cibles (Girardi & Le Grand, 2018; Schulte & Bryja, 2007).

La voie PCP implique également d'autres petites GTPases de la famille Rho (Kohn & Moon, 2005; Singh & Grosschedl, 2005) et d'autres composants principales dans la transduction du signal, à savoir Flamingo(Fmi/ Celsr1), Strabismus (VanGogh-like Vangl), Prickle(Pk) et Diego(Dgo) (Inestrosa *et al.*, 2012). Le bon fonctionnement de cette voie nécessite une distribution spatiale bien déterminée de ces protéines dont certaines fonctions sont encore non connues (Oliva *et al.*, 2013; Veeman *et al.*, 2003).

Dans le but de maintenir leurs fonctions, la plupart des tissus possèdent une organisation tridimensionnelle. La voie PCP est un processus contrôlant l'organisation planaire uniforme de plusieurs tissus épithéliaux. Son aberration affecte ces fonctions tissulaires (Simons & Mlodzik, 2008) et peut entraîner une série de maladies du développement. Ces maladies pourraient être liées à un dysfonctionnement ou à certaines mutations dans l'un de ses composants principaux. Par exemple, les anomalies dans la fermeture du tube neural (Copp & Greene, 2010), le problème d'ouïe, la malformation rénale (maladie polykystique rénale) (Happé *et al.*, 2011) peuvent être le résultat d'une altération de la voie PCP et cette voie peut même avoir un rôle dans le développement des tumeurs et dans la carcinogenèse (Axelrod, 2020; VanderVorst *et al.*, 2019).

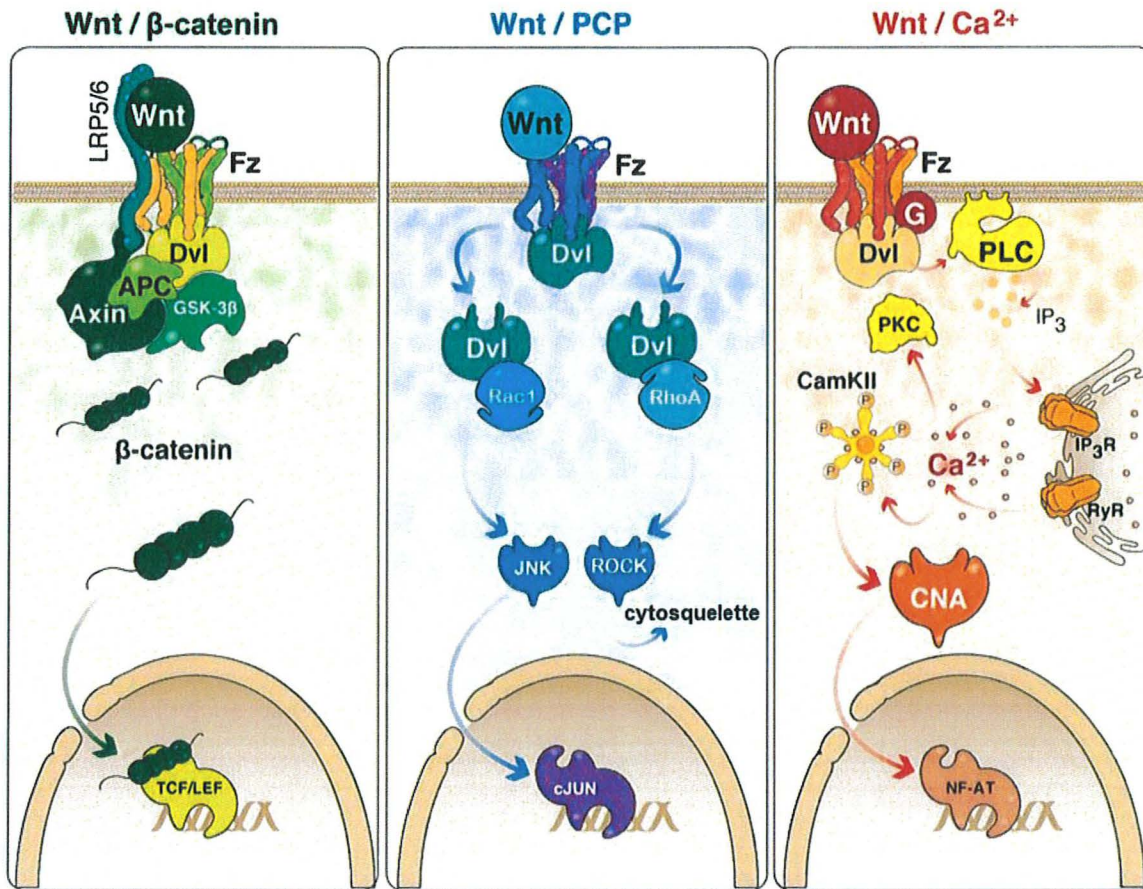


Figure 1.4 Les différentes voies de signalisation Wnt/Fzd

Dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, en absence du ligand Wnt, le complexe de destruction composé de DVL, Axin GSK-3 $\beta$  et APC entraine la phosphorylation et l'ubiquitination de  $\beta$ -caténine causant sa dégradation. En présence du ligand Wnt, sa liaison au récepteur Fzd et son corécepteur LRP5/6 permet le recrutement de DVL et la dissociation du complexe multiprotéique,  $\beta$ -caténine non phosphorylé s'accumule dans le cytoplasme et se déplace vers le noyau où elle induit la transcription des gènes cibles via son interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF. Dans la voie non canoniques Wnt/PCP, la fixation du ligand Wnt sur le récepteur Fzd permet l'activation de DVL qui mène à l'activation des petits GTPases, comme RhoA et Rac1, qui activent à leurs tours, respectivement, la protéine Kinase associée à RHO (ROCK) et la protéine kinase JNK. Ceci mène à l'activation de la voie JNK/c-jun. Dans la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , la fixation du ligand Wnt sur le récepteur Fzd, qui se lie à la protéine G, active DVL et puis PLC. Cette dernière permet la production de DAG et IP<sub>3</sub>, induisant la production de  $\text{Ca}^{2+}$  qui active à son tour CamKII et calcineurin (CNA) régulant l'expression des gènes via le facteur de transcription NF-AT. Modifiée de (Inestrosa & Varela-Nallar, 2014; Staal *et al.*, 2008).

#### 1.4.4 La signalisation Wnt dans les lymphocytes B

La cascade Wnt possède un rôle central dans le fonctionnement du système immunitaire, plus particulièrement, dans la biologie des cellules immunitaires. En fait, la signalisation Wnt est impliquée non seulement dans les CSH, l'origine des cellules immunitaires dans la moelle osseuse, mais également dans les cellules progénitrices lymphoïdes y compris les thymocytes immatures et les progéniteurs B (cellules pro-B et les cellules pre-B) dans la moelle osseuse (Staal & Clevers, 2005). L'importance de la signalisation Wnt dans les LB provient du fait que

différents composants de la voie Wnt (tels que les ligands Wnt, les récepteurs Fzd et le facteur LEF) sont exprimés dans les progéniteurs B (Yu *et al.*, 2008).

En effet, tel que mentionné précédemment, l'un des composants importants de la voie Wnt est le facteur de transcription (LEF1). Ce dernier, est exprimé majoritairement par les pro-B du foie foetal mais il est de faible expression dans les pro-B de la moelle osseuse et minoritairement chez les LB matures (Travis *et al.*, 1991). L'absence de LEF1 affecte la lymphopoïèse B précoce foetale tout en réduisant la prolifération des cellules pro-B et en induisant leur apoptose. De plus, sachant que les ligands Wnt activent le cycle cellulaire et la prolifération des cellules pro-B, l'absence de LEF1 altère la capacité des cellules pro-B à répondre à cette signalisation Wnt (Reya *et al.*, 2000; Staal & Clevers, 2005). Ainsi, probablement la voie Wnt canonique semble avoir un effet stimulant sur les cellules pro-B du foie foetal où les signaux Wnt pourraient réguler la survie et la prolifération des pro-B via LEF1 (Reya *et al.*, 2000; van de Wetering *et al.*, 2002).

En outre, Ranheim *et al.*, ont démontré que les souris déficientes pour Fzd9, un récepteur en amont de la voie Wnt, présentent un développement défectueux des cellules pré-B conventionnelles dans la moelle osseuse (Ranheim *et al.*, 2005). Cette anomalie est observée, plus particulièrement, au niveau de l'auto-renouvellement des progéniteurs B où les cellules subissent une expansion clonale avant le réarrangement des chaînes légères (Wu *et al.*, 2009). Une dérégulation de l'homéostasie des plasmocytes a été observée, aussi, chez les souris Fzd9 KO qui se présente par une accumulation avec l'âge des plasmocytes dans les ganglions lymphatiques (Staal & M. Sen, 2008).

Plus récemment, une étude a montré que la surexpression de  $\beta$ -caténine altère le devenir des progéniteurs lymphoïdes en inversant leur engagement antérieur vers la lignée B et en leur conférant un potentiel de différenciation à plusieurs lignées (Baba *et al.*, 2005; Osugui *et al.*, 2018). En revanche, la délétion spécifique de  $\beta$ -caténine dans les cellules B n'a pas altéré ni leur développement cellulaire dans la moelle osseuse et dans la périphérie ni leurs fonctions cellulaires. D'où, malgré l'importance de LEF1 et Fzd9 dans le développement des LB, la  $\beta$ -caténine semble y être dispensable (Yu *et al.*, 2008).

En outre, Reya *et al.*, ont démontré aussi que le ligand canonique Wnt3a soluble *in vitro* stimule la prolifération des cellules pro-B murines dépendamment de LEF1 mais le Wnt3a ne présente aucun effet sur leur survie (Luis *et al.*, 2009; Reya *et al.*, 2000). Ensuite, afin de comparer la réponse des pro-B murin et humain, Dosen *et al.*, ont étudié l'impact des ligands WNT sur la lymphopoïèse B humaine. Par ailleurs, leur étude révèle que le traitement des pro-B humaines avec WNT3A dans une co-culture avec des cellules stromales induit la stabilisation de la

$\beta$ -caténine et inhibe la lymphopoïèse B *in vitro* en régulant négativement la prolifération cellulaire des pro-B dans la moelle osseuse (Døsen *et al.*, 2006).

D'autres études démontrent que la lymphopoïèse B pourrait être régulée par la voie Wnt non canonique mais son rôle est encore controversé. En effet, il a été rapporté également que le ligand non canonique Wnt5a inhibe la réponse des pro-B à l'IL-7 et régule négativement la prolifération des cellules B via la voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> (Liang *et al.*, 2003). De plus, la suppression de Wnt5a engendre une prolifération accrue de LB entraînant l'apparition des lymphomes à cellules B chez la souris et chez l'homme (Staal & M. Sen, 2008). Mais cette anomalie est intrinsèque aux cellules hématopoïétiques même après la transplantation des cellules stromales sécrétrices de Wnt5a dans la moelle osseuse des souris receveuses Wnt5a KO (Liang *et al.*, 2003). Ces données suggèrent donc que Wnt5a fonctionne comme un suppresseur de tumeur (Døsen *et al.*, 2006). Cependant, d'autres expériences de coculture des cellules stromales exprimant le Wnt5a avec des cellules hématopoïétiques ont montré que le ligand Wnt5a a un effet inducteur sur la lymphopoïèse des cellules B conventionnelles (Famili *et al.*, 2015; Malhotra *et al.*, 2008; Sato & Tamura, 2016).

Ensemble, ces études démontrent ainsi un rôle important de la voie Wnt dans le développement des lymphocytes B et leur devenir cellulaire.

Récemment, une étude a montré que la voie Wnt canonique est activée dans les progéniteurs B1 mais pas dans les cellules B1 matures *in vivo*. En revanche, les deux types cellulaires sont capables de répondre aux ligands Wnt mais d'une manière différente. En fait, il a été rapporté que le signal Wnt canonique (Wnt3a) promeut la prolifération des cellules B1 matures en augmentant l'expression du récepteur à l'IL-7 *in vitro*. Tandis que le ligand non canonique Wnt5a induit l'expansion des précurseurs B1. Ceci suggère que la voie Wnt pourrait réguler certains mécanismes de différents types de cellules B1, tels que leur maintien et leur différenciation cellulaire (Osugui *et al.*, 2018).

## 1.5 La protéine Frizzled6

La protéine transmembranaire Fzd6 est la plus grande protéine de la famille Fzd avec 706 résidus d'acides aminés chez l'homme (Hfz6/FZD6) et son gène est cartographié sur le chromosome humain 8q22.3-q23.1 (Tokuhara *et al.*, 1998). L'ARNm *Fzd6* est détecté dans plusieurs tissus chez l'adulte y compris le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins, le pancréas, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, l'intestin grêle et le côlon de l'adulte. Chez le fœtus, elle est exprimée dans le cerveau, le foie et la plus



grande quantité est trouvée dans les poumons et les reins (Consortium, 2018; Naz *et al.*, 2012; van Amerongen & Nusse, 2009). Le ligand de Fzd6 n'est pas bien déterminé, mais une étude a découvert que, dans les cellules du foie, Wnt4 se fixe sur CRD de Fzd6 en formant un complexe biochimique mais ils ne transmettent pas le signal canonique (Golan *et al.*, 2004).

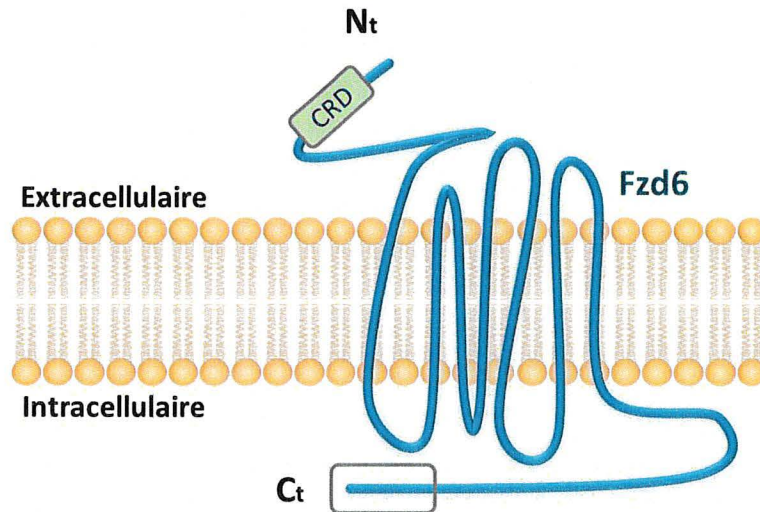


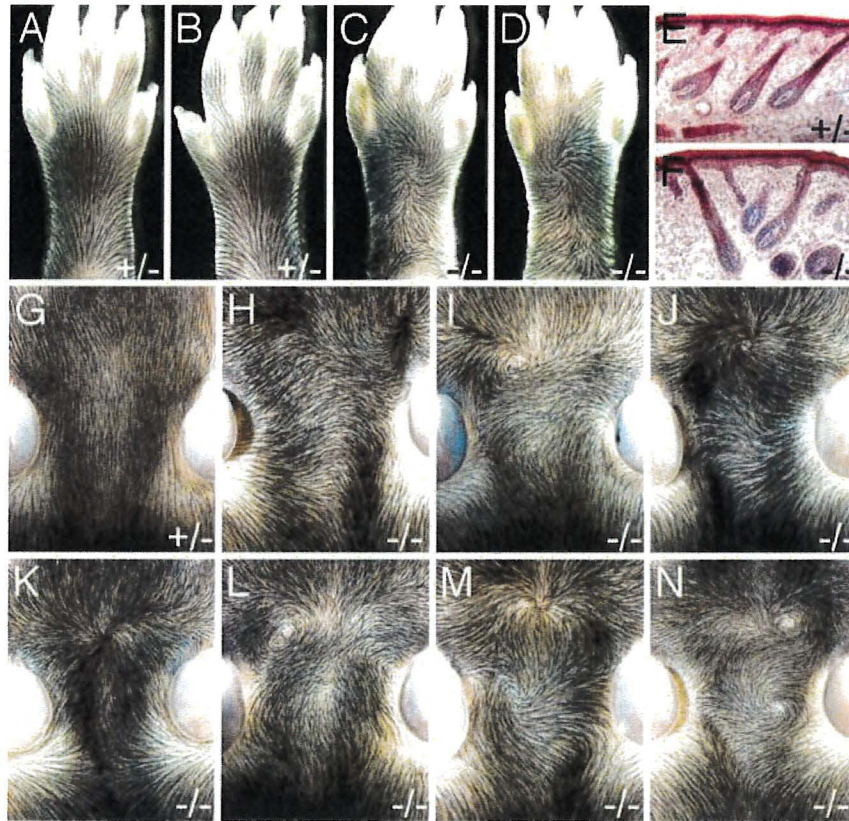
Figure 1.5 Représentation schématique simplifiée de la protéine Frizzled6

Fzd6 est formé de 7 domaines transmembranaires. La partie C-terminal se trouve dans le compartiment intracellulaire et la partie N-terminal dans le compartiment extracellulaire. Ce dernier contient le domaine riche en cystéine (CRD), le site de liaison du ligand Wnt.

### 1.5.1 Fonction

Chez l'homme, la protéine FZD6 présente une identité d'acide aminés de 50% avec FZD3 (Fredriksson *et al.*, 2003), et les deux semblent signaler à travers les voies Wnt/Fzd, notamment, la voie PCP (Zou *et al.*, 2017). Cette voie contrôle l'orientation des follicules pileux recouvrant la majorité de la surface corporelle selon une direction précise par rapport aux axes du corps (Chang *et al.*, 2016). En effet, il a été montré que Fzd3 est nécessaire surtout pour la régulation du système nerveux (la croissance des axones) puisque sa suppression chez la souris (*Fzd3<sup>-/-</sup>*) montre un dysfonctionnement dans la fermeture du tube neural chez les embryons (Wang *et al.*, 2006b). En revanche, les embryons double mutants Fzd6 et Fzd3 montre un tube neural entièrement ouvert, une défaillance dans la fermeture des paupières et des cils mal orientés sur le corps et l'oreille interne (cochlée) (Montcouquiol *et al.*, 2006), ressemblant à un phénotype résultant des altérations dans la voie PCP chez la drosophile Dfz mutant (défauts au niveau des poils et poils des ailes). Les souriceaux *Fzd6<sup>-/-</sup> Fzd3<sup>-/-</sup>* meurent quelques minutes après leurs naissances (De Marco *et al.*, 2012; Ghimire & Deans, 2019; Guo *et al.*, 2004).

Comme il a été mentionné précédemment, les altérations qui touchent les composants de la voie PCP, entraînent soit une mal-orientation oblique, soit une orientation verticale des poils des souris. Notant que Fz6 est exprimé dans la peau et dans les follicules pileux, les mutants Fzd6 ont montré une orientation des poils aléatoire, désordonnée et oblique par rapport à la peau. Ceci est observé sur les pattes postérieures, la tête et le dos, expliquant ainsi une perte partielle de la polarité (Guo *et al.*, 2004). Cependant, la suppression de Fzd3 et Fzd6 ensemble, conduit à une perte totale de polarité antéro-postérieure au niveau de ce tissu (Dong *et al.*, 2018) (**Figure 1.6**). Ces observations montrent le rôle important de Fzd6 dans l'établissement de la polarité planaire, via la voie PCP, des structures biologiques (Cui *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010) ainsi que son impact dans le développement embryonnaire, la régulation de la prolifération cellulaire et la fermeture du tube neural chez la drosophile et les vertébrés.



**Figure 1.6** Comparaison de l'orientation des poils chez les souris Fzd6 KO et Fzd6 WT

(A-D) photos montrant l'orientation des poils au niveau des pieds postérieurs des souris Fzd6 WT et Fzd6 KO. (A et C) Pieds gauches. (B et D) Pieds droits. (E et F) Observation de l'orientation des follicules pileux via la coloration à l'hématoxyline/éosine des échantillons de peau de la surface dorsale du pied postérieur gelées, E montre une orientation ordonnée normale des follicules pileux tandis qu'en F, les  $Fz6^{-/-}$  présentent une morphologie anormale avec une disposition divergente. (G-N) sur les bords ce sont les oreilles des souris, au milieu, les poils sur la surface dorsale de la tête montrent une direction désordonnée des poils chez les souris  $Fz6^{-/-}$ . Tirée de (Guo *et al.*, 2004).

Il a été rapporté que le gène *FZD6* est requis dans le processus du développement des ongles chez l'Homme. En effet, des mutations au niveau de ce gène produisent une protéine tronquée (mutations non-sens et faux-sens) entraînant la dysplasie des ongles autosomique récessive humaine chez plusieurs familles (Fröjmark *et al.*, 2011). Son implication dans ce processus a été renforcé par des études immunohistochimiques des sections des ongles des humains sains (Naz *et al.*, 2012) et les mutations identifiées chez des patients atteints de cette maladie contribuent généralement à une ablation partielle dans la région C-terminale de Fzd6. En outre, il a été démontré que les mutations dans la voie canonique causent l'absence des ongles, tandis que, les mutations touchant FZD6 conduisent à une croissance excessive et incontrôlée des ongles. De plus, des études *in vitro* ont montré que l'élimination de l'extrémité C-terminale dans le FZD6 humain abolit l'activité répressive du FZD6. Puisque ce dernier est connu comme un répresseur

de la voie canonique (Golan *et al.*, 2004) et que l'inactivation de la voie canonique Wnt conduit à l'activation de la voie PCP, il a été suggéré que FZD6 fonctionne en commutation moléculaire entre les différentes voies Wnt pendant le développement des ongles (Naz *et al.*, 2012).

*FZD6* a été associé aux différentes maladies et la mutation de ce gène a été identifiée dans une variété de tumeurs (Zou *et al.*, 2017) où il joue un rôle crucial dans le développement des cancers mais sa fonction exacte est toujours controversée. Une étude consistante avec l'approche de la régulation négative de la voie Wnt dans des cellules cancéreuses (HEK293) par FZD6, a reporté que, parallèlement à cette inhibition en cas de glioblastome, FZD6 promeut la signalisation non canonique par « *Signal transducer and activator of transcription 3* » (STAT3) et « *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* » (NF-κB) via la voie CaMKII–TAK1 (*transforming growth factor-β-activated kinase 1*)–NLK (*Nemo-like kinase*) (Han *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2016).

Des preuves de plus en plus nombreuses montrent que le gène *FZD6* est impliqué dans les cancers. En fait, l'expression de *FZD6* a été associée à une forme agressive de neuroblastome (Cantilena *et al.*, 2011). Il a été détecté aussi à un niveau élevé dans le cas d'hépatocarcinome (Bengochea *et al.*, 2008; Krützfeldt *et al.*, 2012), le carcinome épidermoïde cutané primaire (Haider *et al.*, 2006), le cancer colorectal (Caldwell *et al.*, 2008; Vincan & Barker, 2008) et dans le cancer du sein. Il a été montré que l'activité de la protéine FZD6 est requise pour la croissance, la motilité, l'invasion et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses du sein, mais elle n'est pas impliquée dans leur prolifération cellulaire (Corda & Sala, 2017; Corda *et al.*, 2017).

Bien qu'il existe une relation étroite entre l'expression anormale du gène *FZD6* et la pathogenèse des tumeurs, des études ont montré que FZD6 peut être un suppresseur de tumeurs dans certaines maladies. En fait, Yan *et al.*, ont prouvé que FZD6 réprime la prolifération et la migration des cellules cancéreuses gastriques tout en activant la voie Wnt non canonique (Yan *et al.*, 2016). En outre, Han *et al.*, ont découvert qu'il y a une régulation à la hausse de *FZD6* induite par la lutéoline (un flavonoïde alimentaire doué par son activité anticancéreuse contre les cancers y compris le cancer de prostate). Ce composant provoque une inhibition de la signalisation Wnt et une diminution d'expression des proto-oncogènes C-Myc et Cyclin D1 responsables de la prolifération cellulaire et le développement du cancer de prostate. De plus, une régulation négative de FZD6 prédit un mauvais pronostic (Han *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

Ainsi, explorer les mécanismes de régulation par FZD6 pourrait fournir un traitement plus efficace pour les patients atteints de différentes maladies, essentiellement les cancers.

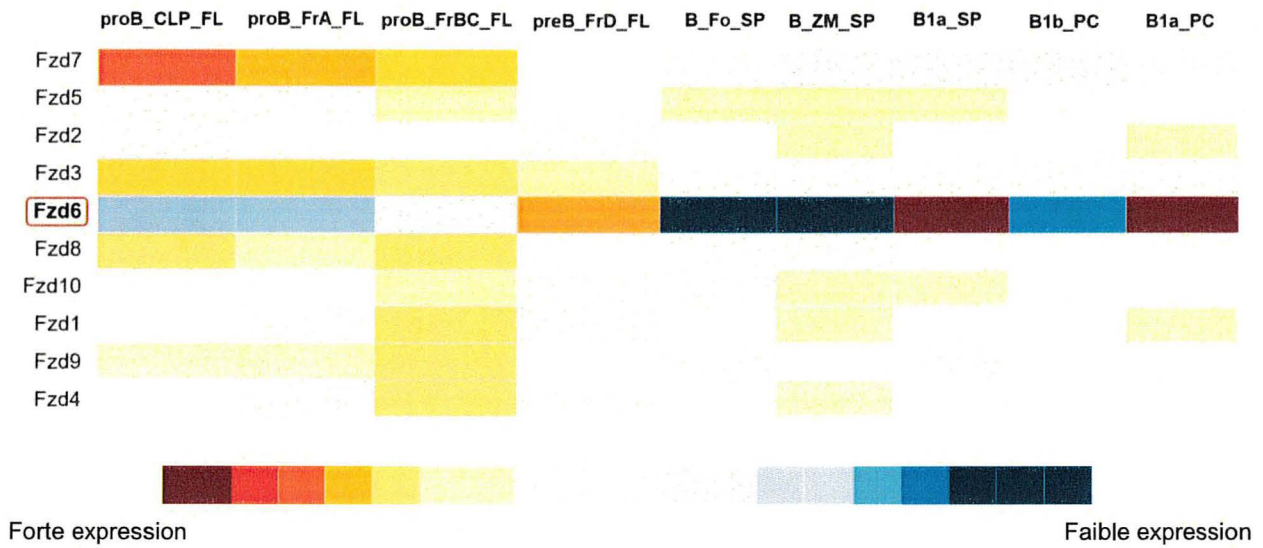
### 1.5.2 Le rôle de Fzd6 dans les cellules hématopoïétiques

Heinonen *et al.*, ont montré que la protéine Fzd6 est nécessaire pour l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques médié par Wnt4 *in vitro* (Heinonen *et al.*, 2011). Le gène *Fzd6* est l'un des gènes surexprimés dans la fraction des cellules progénitrices hématopoïétiques du sang du cordon humain à division lente, ce qui mène à suggérer qu'il a un rôle potentiel dans l'auto-renouvellement (Wagner *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009). Une étude antérieure, dans notre laboratoire, a montré que, dans des expériences de transplantation compétitives des cellules souches progénitrices, la déficience en Fzd6 entraîne une altération dans le maintien des cellules souches et que les cellules progénitrices hématopoïétiques ont pu migrer vers la moelle osseuse mais n'ont pas réussi à reconstituer l'hôte. Plus encore, une forte activation de l'apoptose via la caspase-3 a été observé dans les cellules souches Fzd6 KO engendrant la mort cellulaire. Cette étude a montré donc le rôle crucial et fondamental de Fzd6 dans le maintien, la survie et l'expansion des cellules souches hématopoïétiques tout en régulant leur mécanisme d'auto-renouvellement et sans affecter le processus de différenciation en cellules matures (Abidin *et al.*, 2015).

Le modèle murin E $\mu$ -TCL1 représente des souris transgéniques qui développent spontanément une hyperplasie des cellules B CD5<sup>+</sup> dans le sang périphérique et dans le péritoine, qui évolue ensuite vers une leucémie avec infiltration de la rate, de la moelle osseuse et d'autres organes (Bichi *et al.*, 2002). En utilisant ce modèle murin, Wu *et al.*, ont montré que l'expression de *Fzd6* est régulée à la hausse dans les cellules B malignes CD5<sup>+</sup> (B1a) et qui sont à l'origine de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). En addition, l'ablation du gène *Fzd6* a permis de retarder considérablement le développement de la LLC chez les souris déficientes en *Fzd6* (Janovská & Bryja, 2017; Wu *et al.*, 2009).

### 1.5.3 Le taux d'expression du gène *Fzd6* dans différentes populations B

L'évaluation de l'expression des gènes *Fzd* dans les différentes populations par la base de données « *Immunological Genome Project* » (ImmGen) a montré que parmi les différents membres de la famille *Fzd*, seulement le gène *Fzd6* qui est hautement exprimé dans les B1a et surtout celles qui hébergent la cavité péritonéale (**Figure 1.7**). En revanche, le rôle de ce récepteur dans les B1a est toujours inconnu.



**Figure 1.7** Expression des gènes *Fzd* dans les différentes populations de lymphocytes B

L'expression des gènes *Frizzled* dans les différentes populations et les fractions des lymphocytes B. Dans le foie fœtal (FL), dans la cavité péritonéale (PC), dans la rate (Sp). Les progéniteurs lymphoïdes commun (CLP). Les progéniteurs B (ProB). Les LB de la zone marginale (B\_ZM). Les LB folliculaires (B\_Fo). L'échelle des couleurs en bas montre le taux d'expression. La couleur rouge montre une forte expression du gène et la couleur bleue montre une faible expression du gène, plus la couleur rouge est foncée (à gauche) plus le gène est exprimé, plus la couleur bleue est foncée (à droite) plus l'expression est faible. Les populations suivantes sont classées en ordre décroissant du taux d'expression de Fzd6. B1a\_PC > B1a\_Sp > preB\_FrD\_FL > proB\_FrBC\_FL > proB\_FrA\_FL > proB\_CLP\_FL > B1b\_PC > B\_ZM\_Sp > B\_Fo\_Sp. Tirée de la base de données ImmGen ([Immgen.org](http://Immgen.org)).

## 2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

---

Les lymphocytes B innés (B1a) jouent un rôle important dans certaines maladies telles que la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la septicémie. En cas d'une infection bactérienne, les B1a péritonéales migrent vers la rate et se différencient en cellules activatrices de la réponse innée (IRA) qui secrètent des anticorps naturels de type IgM, le GM-CSF et l'Interleukine-3 (IL-3). Fait intéressant, les cellules IRA ont un double rôle, elles peuvent protéger contre la septicémie comme elles peuvent aggraver l'inflammation causée par l'infection, entraînant ainsi un choc septique et même la mort.

Le gène qui code pour le récepteur Fzd6 de la voie Wnt est sur-exprimé dans les lymphocytes B transformés en cas du cancer et sa délétion a permis d'améliorer la survie des souris leucémiques. Bien qu'il soit connu que les B1a se maintiennent par auto-renouveau pendant la vie adulte et que le gène *Fzd6* est hautement exprimé dans les B1a, rien n'est encore connu sur le rôle de Fzd6 dans ces cellules. De plus, notre laboratoire a montré que l'auto-renouveau des CSH est régulé par Fzd6. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que la protéine Fzd6 a un rôle dans le maintien et le fonctionnement des B1a.

Ainsi, notre projet vise à étudier et à déterminer l'implication de Fzd6 dans le maintien, le développement et la fonction des B1a. Dans notre étude, nous avons comparé différents aspects des cellules B1a moyennant des souris de type sauvage (Fzd6 WT) et des souris déficientes en Fzd6 (Fzd6 KO). Afin d'évaluer notre hypothèse, les principaux objectifs suivants ont été fixés :

1. Étudier le rôle de Fzd6 dans le maintien des cellules B1a à l'état d'équilibre
2. Déterminer le rôle de Fzd6 dans la différenciation des B1a *in vivo*
3. Étudier le rôle de Fzd6 dans la différenciation des B1a en IRA *in vitro*
4. Évaluer l'impact de Fzd6 dans le développement des progéniteurs des B1a (P-B1)

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer le rôle de Fzd6 dans le maintien des B1a dans des conditions homéostatiques. Nous avons identifié et comparé, entre des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT, les différentes fractions des progéniteurs B dans la moelle osseuse ainsi que les lymphocytes B1a de la moelle osseuse, la rate et la cavité péritonéale.

Pour le deuxième objectif, afin d'évaluer la capacité proliférative des lymphocytes B1a et leur différenciation en IRA *in vivo*, nous avons injecté des souris Fzd6 WT et KO avec des

lipopolysaccharides bactériens (LPS). Plusieurs paramètres ont été ensuite testés et comparés entre les deux souris tels que les signes cliniques, la fréquence et le nombre des IRA développées dans les différents organes ainsi que la production de GM-CSF.

Dans le but de vérifier si l'impact de Fzd6 sur la différenciation de B1a en IRA observé *in vivo* est spécifique et intrinsèque à ces cellules, nous avons eu recours à des cultures cellulaires des cellules B1a purifiées du péritoine *in vitro*, en les stimulant avec le LPS. La capacité productive de GM-CSF a été évaluée via un marquage intracellulaire.

Pour le dernier objectif, selon une récente étude montrant que les progéniteurs B1 (P-B1) et les B1 matures répondent différemment à la signalisation Wnt (Osugui *et al.*, 2018), nous avons testé le rôle de Fzd6 dans le développement et le maintien des P-B1. Dans cette partie, les progéniteurs ont été prélevés à partir des foies fœtaux et à partir de la moelle osseuse et leurs taux ont été comparés entre des souris Fzd6 WT et KO.



## 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### 3.1 Le modèle animal

Dans chaque expérience, les souris déficientes en Fzd6, Fzd6 KO (-/-) dites conventionnelles (Abidin *et al.*, 2015), ont été comparées à des souris de type sauvage Fzd6 WT (+/+) (Guo *et al.*, 2004). Toutes les souris utilisées ont été élevées et logées, dans des conditions stériles, à l'animalerie ou le Centre National de Biologie Expérimentale (CNBE) de l'Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, en comblant tous les besoins de l'animal. Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux directives du Conseil Canadien pour la Protection des Animaux (CCPA). Les protocoles ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA). Les manipulations ont été faites au CNBE.

### 3.2 Euthanasie des souris

Les souris sont placées pendant 3-4 minutes dans une chambre remplie de CO<sub>2</sub>, puis une dislocation cervicale a été faite par la rupture de la moelle épinière cervicale et des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau.

### 3.3 Préparation des tampons utilisés

#### 3.3.1 Tampon de cytométrie en flux (Tampon CF)

La solution tamponnée de cytométrie en flux (Tampon CF) a été préparée au laboratoire à partir du tampon phosphate salin (PBS) 1X ajusté au pH 7,4 (137 mM de NaCl (8 g/L), 2,7 mM de KCl (0,2 g/L), 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O (1,44 g/L) et 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24 g/L) supplémenté de 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma-Aldrich) et de 0,5 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Ensuite la solution a été filtrée sous l'enceinte biologique pour la stériliser et elle a été toujours conservée à 4°C. Le tampon CF a été utilisé dans la préparation des dilutions des anticorps, dans la préparation des suspensions cellulaires, dans le marquage cellulaire et les étapes de lavage requises pour la coloration de surface ainsi que son ajout dans les tubes pour l'analyse à la cytométrie en flux.

#### 3.3.2 Tampon de lavage péritonéal

Le tampon utilisé pour le lavage péritonéal a été préparé au laboratoire à partir du PBS 1X supplémenté de 2% de sérum de veau fœtal très faible en endotoxine (FBS premium, Wisent inc)

et de 1 mM d'EDTA. Il a été ensuite filtré sous l'enceinte biologique pour le stériliser et a été conservé toujours à 4°C.

### **3.4 Prélèvement des organes et préparation des suspensions cellulaires**

#### **3.4.1 Récolte d'organes *ex vivo***

À l'animalerie, sous l'enceinte et dans les conditions stériles, l'abdomen de la souris euthanasiée au CO<sub>2</sub> a été aspergé d'éthanol 70%. Un dépouillement du ventre a été effectué, suite à une petite incision faite au niveau du ventre. Puis, environ 5 mL du tampon de lavage stérile a été introduit dans la cavité péritonéale par l'insertion, en bas de l'abdomen, d'une seringue à aiguille de calibre 21G. Avec la pointe de l'aiguille, le trou a été bloqué par une légère aspiration d'une partie de graisse et afin de déloger le plus possible de cellules libres, l'abdomen de la souris a été légèrement massé. Enfin, le liquide a été retiré par la seringue et le contenu des deux/trois lavages de chaque souris a été mis dans un tube de 15 mL. L'action d'aspiration du liquide doit se faire de manière très douce afin de ne pas transpercer les intestins ou les organes internes.

Ensuite, une ouverture au niveau de l'abdomen a été effectuée afin d'atteindre les organes internes, la rate a été prélevée et mise dans une boîte de pétri de 35-mm contenant 3 mL du Tampon CF. Les os d'une patte de souris (fémur et tibia) ont été récoltés et mis aussi dans une boîte de pétri contenant du Tampon CF. Tous les organes ont été placés sur glace.

Au laboratoire, les cellules de la moelle osseuse ont été récoltées, dans un tube de 15 ml, par rinçage répété des os (fémur et tibia) avec 3 mL du Tampon CF (volume initial, Vi) en utilisant une seringue avec une aiguille de calibre 25G.

Les suspensions cellulaires spléniques ont été obtenues par dilacération de la rate, avec un piston de seringue de 5 ml, dans une boîte de pétri contenant 3 mL de tampon CF (Vi). Après avoir enlevé tous les agrégats, la suspension a été déposée dans un tube de 15 ml.

Suite à l'ajustement des volumes des suspensions cellulaires avec du tampon CF, les tubes contenant ces suspensions ont été centrifugés pendant 10 min à 233 x g à 4°C. Les surnageants ont été ensuite versés.

#### **3.4.2 Comptage des cellules**

À partir du volume initial, 10 µL de chaque suspension cellulaire ont été mélangés avec le colorant Bleu de Trypan (Gibco) (le bleu de trypan a été dilué dans du PBS 1/10). Les cellules mortes sont colorées en bleu alors que celles vivantes sont réfringentes avec une apparence dorée

et lumineuse au microscope. Ensuite 10 µL de la suspension diluée a été introduit dans la brèche de l'hémacytomètre pour compter manuellement le nombre de cellules vivantes (N) ayant une taille moyenne supérieure à celle des érythrocytes. La concentration des cellules obtenue par l'hémacytomètre est  $N / 10^{-4}$  qui est  $N \times 10\ 000$  cellules/mL.

Un calcul a été fait selon la formule ci-dessous pour déterminer les volumes dans lequel chaque culot obtenu de la centrifugation (**section 3.4.1**) a été resuspendu ( $V_f$ ) afin d'avoir une concentration finale ( $C_f$ ) de 100 millions cellules/mL.

$$V_f = ((N \times 10\ 000) \times \text{facteur de dilution} \times V_i) \div (C_f)$$

### 3.5 Préparation des échantillons à analyser par cytométrie en flux

#### 3.5.1 Marquage extracellulaire des cellules

Afin de bloquer les liaisons non spécifiques, un volume de 10 µl qui est l'équivalent d'un million de cellules de chaque suspension a été prélevé dans un tube de cytométrie en flux (tube CF) et a été ensuite incubé avec 1 µg/million de cellules de bloqueur des récepteurs Fc « Anti-CD16/32 » (2.4G2, BD Biosciences) pendant 5 min à température ambiante. Un marquage à la surface des cellules a été effectué par l'ajout du mélange des anticorps, préparé préalablement, pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité. Les cellules ont été ensuite lavées avec 2 mL du tampon CF et centrifugées à 193 x g pendant 5 min. Après avoir versé les surnageants, les cellules ont été ensuite remises en suspension dans 200 µL du tampon CF froid.

Les mélanges d'anticorps utilisés pour identifier les B1a matures dans les conditions homéostatiques (**Tableau 3.1**), les cellules IRA obtenues *in vivo* après injections des souris par LPS (**Tableau 3.2**), les cellules IRA obtenues en culture *in vitro* (**Tableau 3.3**) et les progéniteurs B1 (**Tableau 3.4**) sont détaillés ci-dessous.

**Tableau 3.1 Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les B1a de la rate, la cavité péritonéale et la moelle osseuse ainsi que les fractions des progéniteurs B dans la moelle osseuse dans les conditions homéostatiques**

<b>Molécule ciblée par l'anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Dilution (1:X)</b>	<b>Clone</b>	<b>Compagnie</b>
<b>B220</b>	FITC	300	RA3-6B2	BD Biosciences
<b>IgM</b>	PerCP eF710	400	II/41	eBioscience
<b>CD19</b>	PE	800	1D3	eBioscience
<b>CD23</b>	BV711	200	B3B4	BD Biosciences
<b>IgD</b>	APC	800	11-26c	eBioscience
<b>CD11b</b>	APC-Cy7	800	M1/70	BioLegend
<b>CD5</b>	BV421	400	53-7.3	BD Horizon

**Tableau 3.2 Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA de la rate, la cavité péritonéale et la moelle osseuse *in vivo***

<b>Molécule ciblée par l'anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Dilution (1:X)</b>	<b>Clone</b>	<b>Compagnie</b>
<b>CD43</b>	PE-Cy7	300	S7	BD Biosciences
<b>CD93</b>	eFluor 450	300	AA4.1	eBioscience
<b>CD19</b>	PE	800	1D3	eBioscience
<b>CD49d (VLA-4)</b>	PerCP Cy5.5	200	R1-2	eBioscience
<b>CD11a/CD18 (LFA-1)</b>	APC	400	H155-78	BioLegend
<b>CD23</b>	BV711	200	B3B4	BD Biosciences

**Tableau 3.3 Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA obtenus en culture *in vitro***

<b>Molécule ciblée par l'anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Dilution (1:X)</b>	<b>Clone</b>	<b>Compagnie</b>
<b>CD43</b>	PE-Cy7	300	S7	BD Biosciences
<b>CD138</b>	APC-R700	800	281-2	BD Biosciences
<b>CD19</b>	BV605	400	1D3	BD Biosciences
<b>CD5</b>	FITC	400	53-7.3	BD Pharmingen

**Tableau 3.4 Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les progéniteurs B1 de la moelle osseuse et le foie fœtal dans des conditions homéostatiques**

<b>Molécule ciblée par l'anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Dilution (1:X)</b>	<b>Clone</b>	<b>Compagnie</b>
<b>CD93</b>	APC	300	AA4.1	eBioscience
<b>B220</b>	APC-Cy7	200	RA3-6B2	BD Biosciences
<b>CD19</b>	PE	800	1D3	eBioscience
<b>CD11b</b>	Biotin	400	M1/70	BD Pharmingen
<b>Ter119</b>	Biotin	800	TER-119	BD Pharmingen
<b>CD3e</b>	Biotin	400	145-2C11	BD Pharmingen
<b>NK1.1</b>	Biotin	400	PK136	BD Pharmingen
<b>Ly6C/Ly6G (Gr1)</b>	Biotin	400	RB6-8C5	BD Pharmingen
<b>Streptavidine</b>	FITC	1600	-	BD Pharmingen

### **3.5.2 Marquage intracellulaire du GM-CSF produit par les IRA**

- Stimulation *In vivo*

Dans le but d'améliorer la détection de la cytokine intracellulaire tout en bloquant son transport au complexe de Golgi, 5 millions de cellules de chaque suspension splénique obtenue des souris (Fzd KO injectée, Fzd6 WT injectée (**section 3.6**), souris contrôle non injectée, contrôle sans fluorescence de GM-CSF « *Fluorescence Minus One* » (FMO GM-CSF)) ont été mises dans une boîte de pétri non adhérente contenant 3 mL du milieu de culture « *Dulbecco's Modified Eagle Medium* » DMEM (Gibco, contenant 10% FBS, 50 µg/mL Gentamicin (Gibco) et 500 mM 2-Mercaptoéthanol (Gibco)) supplémenté de l'inhibiteur d'exocytose (GolgiStop), Brefeldine A (1000X, eBioscience) à une concentration finale 1X de 3 µg/mL par boîte pendant 4 heures à 37°C. Les boîtes ont été ensuite lavées par 500 µL du tampon CF et leurs contenus ont été déposés dans des tubes CF. Ces derniers ont été centrifugés à 233 x g pendant 5 min et leur marquage extracellulaire (**Section 3.5.1**) a été fait avec le mélange d'anticorps préparé (**Tableau 3.5**) après avoir versé les surnageants et re-suspendu les cellules. Une fois les cellules marquées à la surface, elles ont été fixées et perméabilisées selon les instructions du kit de marquage intracellulaire Foxp3 (eBioscience) puis elles ont été incubées toute la nuit avec l'anticorps PE anti-GM-CSF dilué 1:200 (MP1-22E9, BD Biosciences) (concentration choisie après titration des anticorps), suite au blocage des sites non spécifiques par ajout de 2% de sérum de rat (STEMCELL Technologies) pendant 30 min sur glace. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec la solution de perméabilisation diluée du kit, et ont été centrifugées pendant 5 min à 378 x g.

Après avoir versé les surnageants, les cellules ont été ensuite remises en suspension dans 200  $\mu$ L de tampon CF froid et analysées à la cytométrie en flux.

- Stimulation *In vitro*

Pendant les 4 dernières heures d'incubation des cellules (**section 3.7**), 1X qui est l'équivalent de 3  $\mu$ g/mL de Brefeldine A (1000X, eBioscience) a été ajouté aux puits afin de bloquer l'exocytose des cytokines. Ensuite, le contenu de chaque puit lavé par 500  $\mu$ L du tampon CF a été transféré dans un tube CF et centrifugé à 233 x g pendant 5 min à 4°C. Après la centrifugation, un volume d'environ 100  $\mu$ L a été gardé dans le tube et un marquage extracellulaire et intracellulaire de GM-CSF (**Tableau 3.5**) ont été réalisés de la même façon décrite précédemment dans la partie *in vivo*.

**Tableau 3.5** Mélange d'anticorps de marquage extracellulaire et intracellulaire pour identifier, par cytométrie en flux, les IRA de la rate *in vivo* et *in vitro*

Molécule ciblée par l'anticorps	Fluorochrome	Dilution (1:X)	Clone	Compagnie
CD43	PE-Cy7	300	S7	BD Biosciences
CD93	eFluor 450	300	AA4.1	eBioscience
CD19	BV605	400	1D3	BD Biosciences
CD23	BV711	200	B3B4	BD Biosciences
GM-CSF	PE	200	MP1-22E9	BD Biosciences

### 3.6 Détermination de la sensibilité aux LPS *in vivo*

Les souris femelles C57BL/6 ont reçu une injection intrapéritonéale i.p de LPS stérile à une dose de 3 mg/kg (Escherichia coli O111:B4, L4391-1MG, Sigma-Aldrich) alors que les souris contrôles n'ont pas été injectées. Les signes cliniques (poids, yeux, poils, mobilité, comportement, hydratation et diarrhée) des souris injectées ont été suivies deux fois par jour, à 6h, 24h, 32h, 48h, 56h et 72 heures. Un score a été attribué à chaque signe clinique selon la sévérité. Le 3ème jour, les cellules du péritoine, de la moelle osseuse et de la rate ont été récoltés et comptés comme décrit dans la **section 3.4**. Les cellules ont été ensuite analysées à la cytométrie en flux (**Tableau 3.2** et **Tableau 3.5**)

### 3.7 Enrichissement en cellules B1a et mise en culture *In vitro*

Avant de procéder dans la sélection négative des cellules B1a, un million de cellules a été prélevé de chaque suspension cellulaire péritonéal ajustée à 100 millions cellules/mL (**sections 3.4**) et a été analysé par cytométrie en flux (**section 3.5.1**). Le reste de chaque suspension a été transféré dans un tube CF et a été incubé avec le bloqueur des récepteurs Fc anti-CD32CD16 (1 µg/million de cellules) pendant 5 min à température ambiante. Ensuite les cellules ont été incubées pendant 15 min à température ambiante avec 2,5 µg/mL des anticorps biotinylés anti-CD3e (145-2C11, BD Biosciences), anti-CD23 (B3B4, eBioscience), anti-F4/80 (BM8, BD Biosciences), et anti-CD115 (c-fms) (AFS98, eBioscience) ciblant, respectivement, les lymphocytes T, les lymphocytes B2, les macrophages et les monocytes. Des billes magnétiques du kit d'enrichissement EasySep (STEMCELLS Technologies) liées à la streptavidine ont été ajoutées au mélange. Les tubes ont été ensuite mis dans l'aimant et les cellules non désirées marquées par les anticorps biotinylés ont été attachées aux billes via la streptavidine et ont été restées fixer sur les parois des tubes (**Figure 3.1**). Les suspensions enrichies en B1a CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> déposées dans des nouveaux tubes CF ont été centrifugées pendant 5 min à 233 x g à 4°C. Les cellules ont été comptées de nouveau et 1 million de cellules de chaque tube a été prélevé pour l'analyser à la cytométrie en flux. En utilisant le marquage des B1a décrit dans le **Tableau 3.1**, la composition des mélanges avant et après la sélection négative a été comparée.

Après le comptage des cellules, le reste de la suspension péritonéale de chaque souris enrichie en B1a a été divisé dans deux puits d'une plaque de 24 puits avec une densité d'environ  $5 \times 10^5$  cellules/mL, où chaque puit contient du milieu DMEM avec 10% FBS inactivé à la chaleur, 50 µg/mL de Gentamicin et 50 µM de 2-Mercaptoéthanol. Un puit control sans LPS a été fait pour chaque puit supplémenté de 10 µg/mL de LPS. De plus, un 5ème puit a été ajouté pour servir comme un control FMO de GM-CSF. Après, les cellules ont été incubées dans un incubateur à 5% CO<sub>2</sub> humidifié à 37°C pendant 48heures. Les cellules cultivées *in vitro* ont été ensuite récoltées et analysées à la cytométrie en flux suite aux étapes décrites dans la **section 3.5.2**.

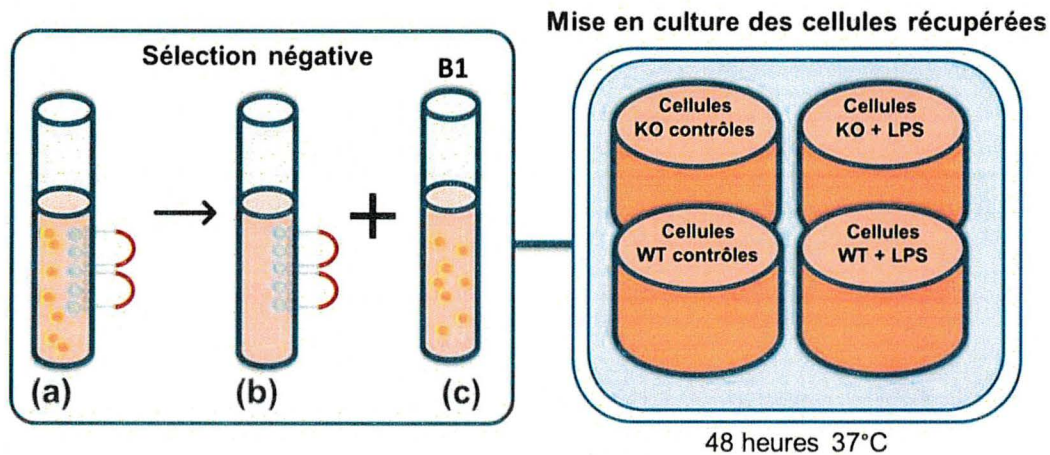


Figure 3.1 Schéma simplifié de l'enrichissement en B1a et leur mise en culture

A gauche, les étapes de la sélection négative. (a) Le mélange contient toutes les cellules péritonéales (En orange sont les cellules B1a et en gris toutes les autres cellules marquées par les anticorps biotinylés CD3e, CD23, CD115 et F4/80 (b) qui s'attachent aux billes magnétiques fixées sur la paroi du tube). (c) la suspension enrichie en B1a. A droite, la mise en culture des cellules B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT (avec LPS) et leurs puits contrôles (sans LPS). La plaque a été mise dans un incubateur pendant 48h à 37°C à 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.8 Isolation des progéniteurs B1

#### 3.8.1 Isolation des progéniteurs B1 des moelles osseuses adultes

Les suspensions cellulaires de la moelle osseuse des jeunes souris femelles ont été récoltées et préparées de la même façon décrite dans la **section 3.4** et **3.5.1** et le mélange des anticorps utilisé est décrit dans le **Tableau 3.4**.

#### 3.8.2 Isolation des progéniteurs B1 des foies fœtaux

À l'animalerie, nous avons fait le croisement de 4 souris mâles avec 8 femelles hétérozygotes où chaque deux souris femelles ont été mises avec un mâle dans une cage pendant 2 jours. Le matin du 3<sup>ème</sup> jour, nous avons séparé les femelles des mâles. Le matin du 15<sup>ème</sup> jour (l'équivalent du jour 14.5 post-coitum), les femelles gestantes obtenues ont été euthanasiées. Ensuite, nous avons ouvert le ventre de chaque femelle gestante, l'utérus contenant environ 9 fœtus de chaque souris a été prélevé et mis dans une boîte de pétri rempli du tampon CF froid. Chaque fœtus a été isolé de son sac vitellin et son placenta. Une partie de la queue de chaque fœtus a été enlevée pour faire le génotypage (dans notre étude nous avons réussi à obtenir 4 fœtus Fzd6 WT et 5 fœtus Fzd6 KO). Le foie fœtal a été retiré ensuite du tissu conjonctif qui l'entoure par la pince. Chaque foie a été mis dans un puit d'une plaque de 24 puits contenant 500 µL de tampon CF. Des pipetages répétés ont été effectués pour dissocier les foies fœtaux afin d'obtenir des



suspensions cellulaires bien homogènes. Le contenu de chaque puit a été passé à travers le tamis de 35  $\mu\text{m}$  dans un tube CF. Le bouchon a été lavé par 500  $\mu\text{L}$  de tampon CF pour avoir un volume final de 1 ml. Ensuite, les tubes obtenus ont été centrifugés à 193 x g à 4°C pendant 5 min et un volume d'environ 400  $\mu\text{L}$  a été laissé dans chaque tube. La suspension cellulaire a été ensuite utilisée pour analyser à la cytométrie en flux les progéniteurs B1 marqués (**Tableau 3.4**).

### **3.9 Cytométrie en flux**

Environ 200  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire de chaque échantillon mis dans les tubes CF ont été acquis par BD LSR Fortessa cell analyser (BD), et ensuite les résultats ont été analysés avec le logiciel BD FACS Diva software.

### **3.10 Statistiques**

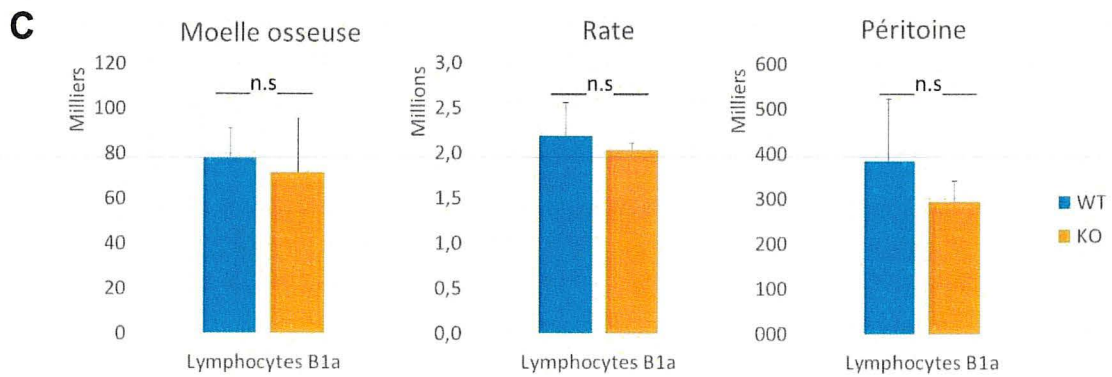
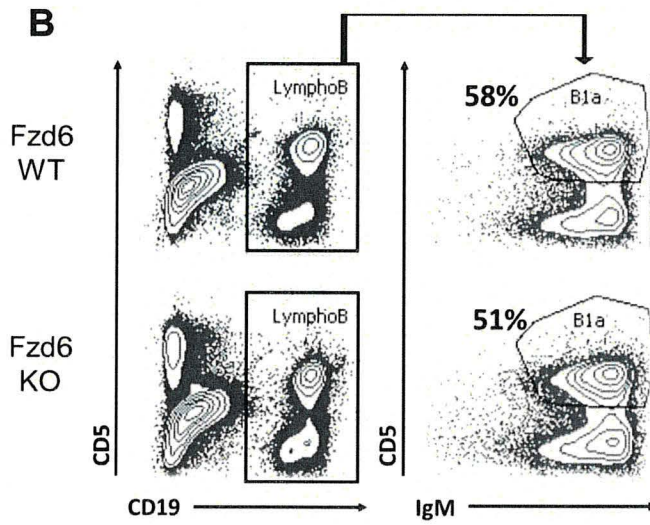
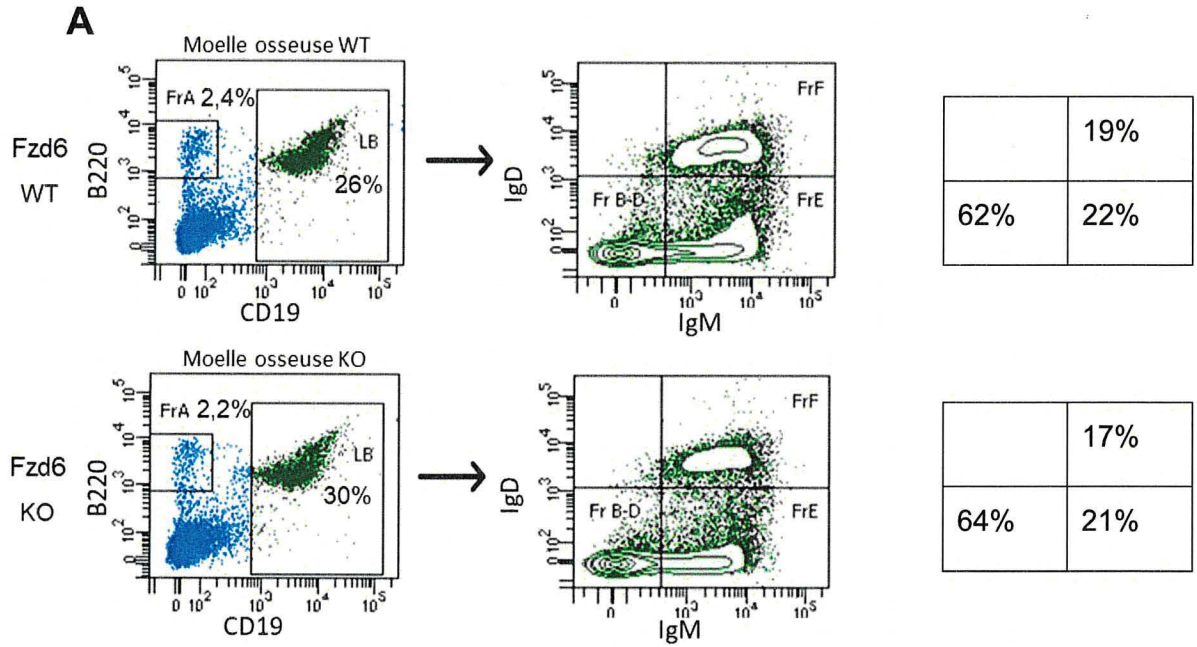
Les analyses statistiques ont été effectuées par Student t-test. Chaque valeur représente au moins trois expériences indépendantes. Les données avec un p-value inférieure à 0.05 ( $p < 0.05$ ) sont jugées statistiquement significatives.

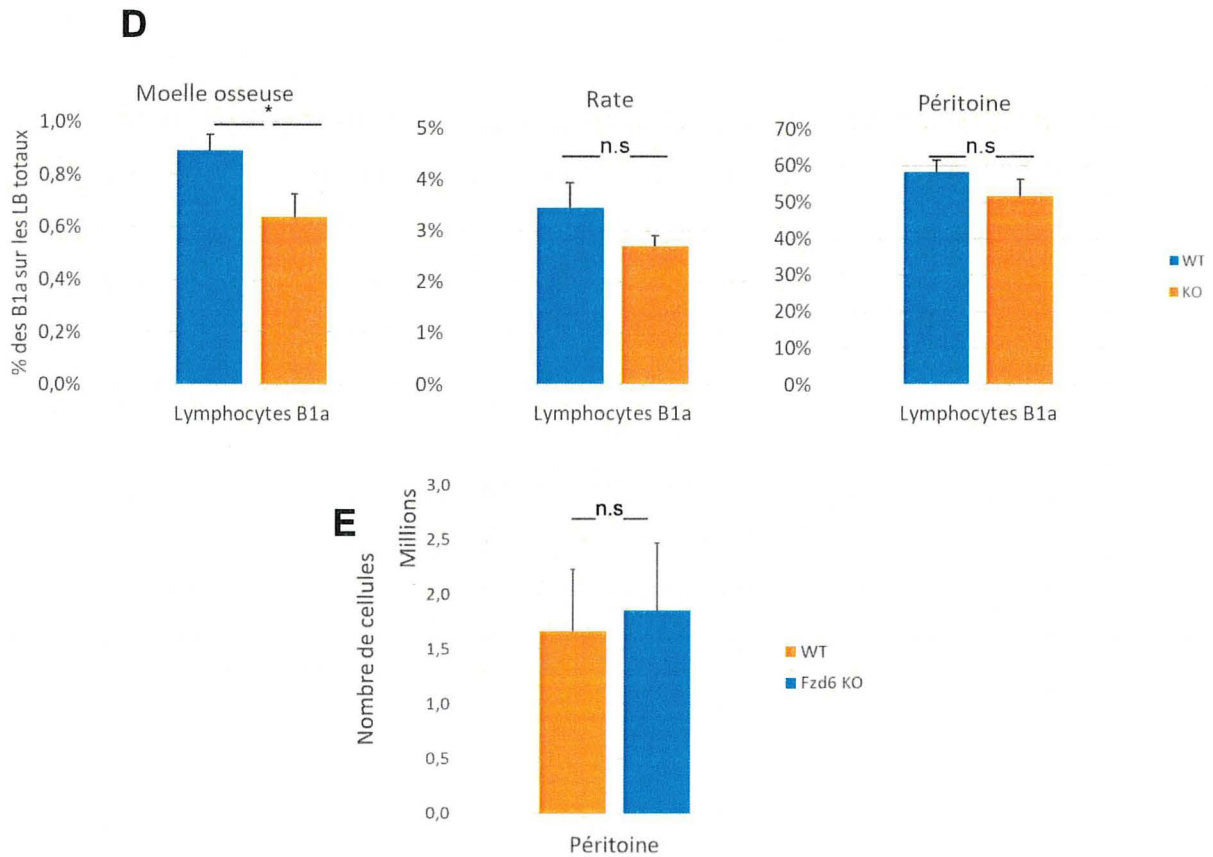
## 4 RÉSULTATS

---

### 4.1 *Frizzled6* n'est pas nécessaire pour le maintien des cellules B1a dans les conditions normales

La protéine *Fzd6* joue un rôle important dans le maintien et la régulation de l'auto-renouvellement des CSH (Abidin *et al.*, 2015). Il a été démontré que son gène est hautement exprimé dans les lymphocytes B1a qui utilisent également le mécanisme d'auto-renouvellement pour se maintenir. Mais rien n'est encore connu sur le rôle de *Fzd6* chez ces cellules. Afin de tester si *Fzd6* est nécessaire pour le maintien des B1a à l'état basale, nous avons eu recours à la comparaison du taux de différentes populations cellulaires de lymphocytes B, notamment, les B1a entre des souris C57BL/6 *Fzd6* KO et des souris contrôles *Fzd6* WT dans des conditions homéostatiques. La stratégie utilisée a été basée sur la caractérisation et la quantification *ex vivo*, par cytométrie en flux, des cellules B1a prélevées des trois organes à savoir la rate, la cavité péritonéale et la moelle osseuse des souris *Fzd6* KO et WT. Les lymphocytes B totaux CD19<sup>+</sup> ainsi que les différentes fractions des progéniteurs B dans la moelle osseuse, Fraction **A** (B220<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>), **B-D** (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>), **E** (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>) et **F** (B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>) ont été identifiés grâce au marquage extracellulaire (**Figure 4.1A**). Aucune altération de leurs proportions n'a été constatée chez les souris *Fzd6* KO en comparaison avec les souris contrôles WT (**Figure 4.1A**). Ceci concorde avec des résultats obtenus auparavant dans notre laboratoire où les proportions de divers sous-populations lymphoïdes *Fzd6* KO et WT ont été similaires dans la MO et dans les organes lymphoïdes (rate et thymus) (Abidin *et al.*, 2015). Au niveau de la cavité péritonéale, la rate et la moelle osseuse, les B1a ont été distingués des autres sous-populations de LB (B2 et B1b) grâce à leurs marqueurs spécifiques à leurs surfaces CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> (**Figure 4.1B**). En plus, des résultats similaires ont été obtenus au niveau du nombre des B1a dans les trois organes ainsi que leur fréquence dans la rate et le péritoine sauf au niveau de la moelle osseuse où le pourcentage des B1a a présenté seulement 0.6% des LB en absence de *Fzd6* alors que les B1a chez les souris *Fzd6* WT forment 0.9% des LB totaux (**Figure 4.1C et Figure 4.1D**). En outre, aucun effet n'a été observé sur le nombre des cellules total dans le péritoine chez les deux types de souris (**Figure 4.1E**). Donc, *Fzd6* ne semble pas être important dans le maintien des B1a à l'état d'équilibre.



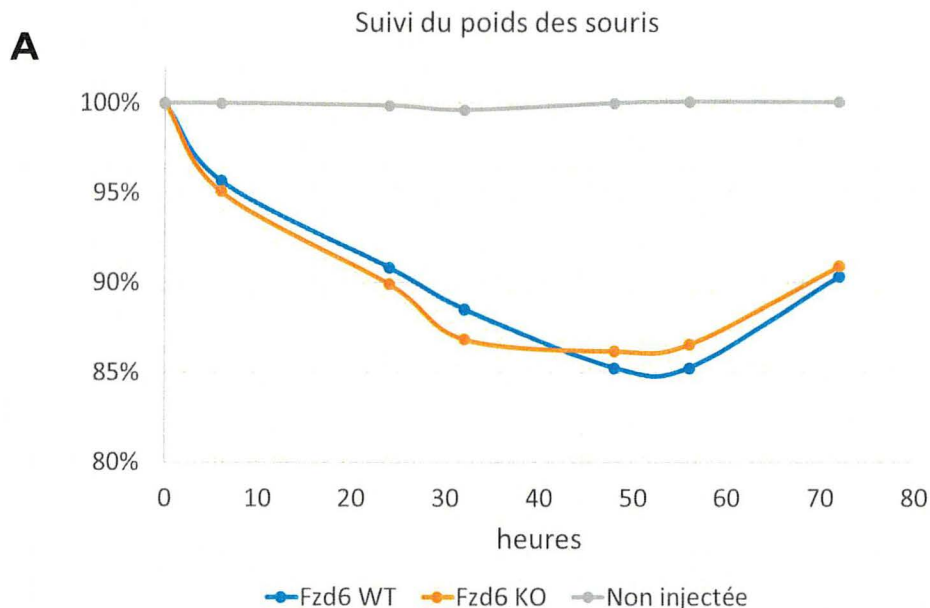


**Figure 4.1** Frizzled6 n'a pas d'impact sur le maintien des cellules B1a dans les conditions homéostatiques

(A) Analyses et identification par cytométrie en flux de différentes sous-populations de la moelle osseuse des souris Fzd6 KO et leurs contrôles WT, Lymphocytes B (LB), Fraction A (FrA), Fraction B-D (FrB-D), Fraction E (FrE) et Fraction F (FrF). Les pourcentages dans la figure à gauche sont représentés sur les cellules totales vivantes et les pourcentages dans le tableau à gauche sont représentés sur les LB. (B) Stratégie d'identification des cellules B1a à partir des cellules prélevées des trois organes, moelle osseuse, rate et péritoine, Lymphocytes B (LymphoB). (C) Nombre total des cellules B1a dans les trois organes prélevées moelle osseuse, rate (N=4) et péritoine (N=6), 1 souris Fzd6 KO et 1 souris Fzd6 WT/ expérience. (D) pourcentage des cellules B1a sur les lymphocytes B totaux (CD19<sup>+</sup>). (E) Nombre absolu de cellules total (N=4, 1 souris Fzd6 KO et 1 souris Fzd6 WT/ expérience). Les souris femelles sont âgées de 2-3 mois. n.s = non significatif \*p<0.05 (Test student) (les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

## 4.2 L'absence du gène *Fzd6* entraîne une tendance à la hausse des cellules IRA et une diminution de production de GM-CSF par les IRA *in vivo*

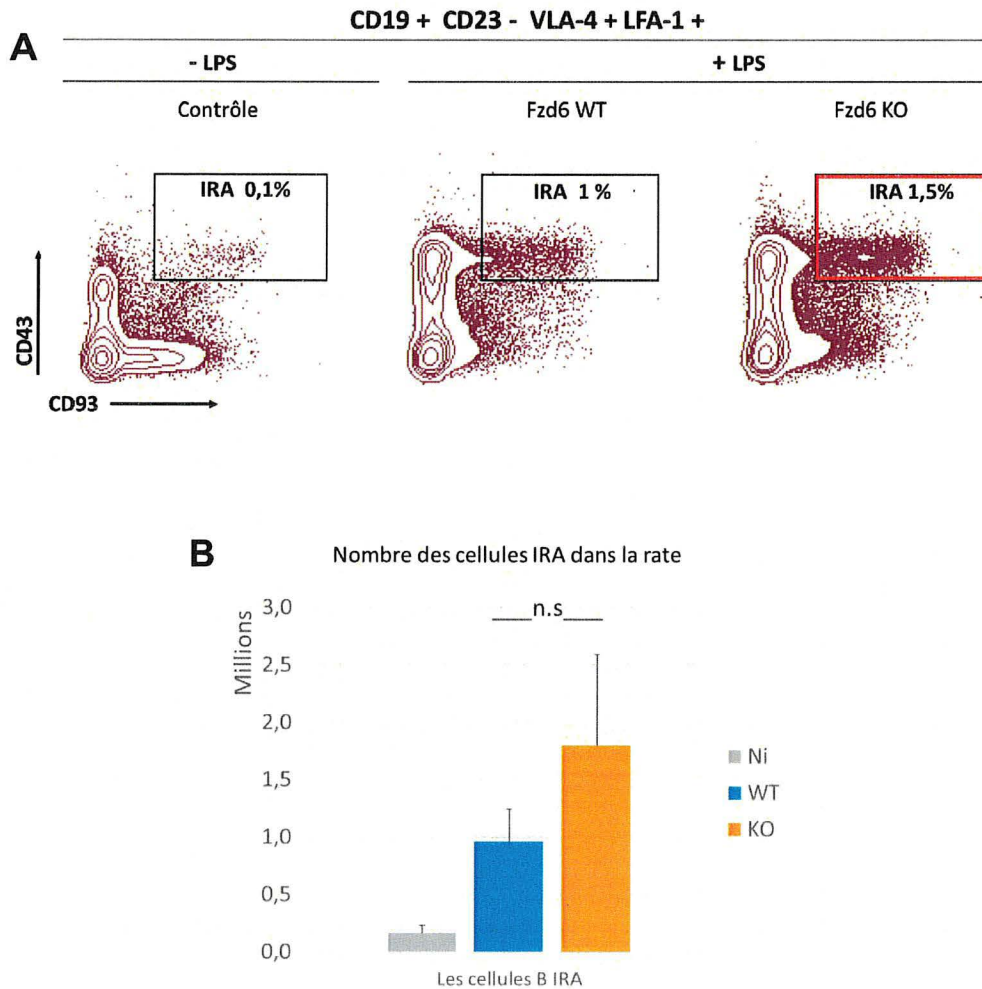
La protéine Fzd6 semble ne pas avoir un rôle dans le maintien des cellules B1a à l'état d'équilibre, mais elle pourrait avoir un rôle dans la fonction des B1a. En effet, une étude antérieure a montré que, chez des souris modèles développant la leucémie lymphoïde chronique, les cellules B1a CD5<sup>+</sup> leucémiques ont montré une expression accrue du gène *Fzd6* et qu'en son absence, la survie des souris a été améliorée sans affecter le développement des LB y compris les B1a (Wu *et al.*, 2009). Ceci suggère que la prolifération ou les fonctions des B1a pourraient être affectées chez la souris Fzd6 KO, même si leurs nombres demeurent stables. D'un autre côté, les B1a ont un rôle fondamental dans la réponse immunitaire innée contre les virus, certains parasites et les bactéries. Ces cellules jouent un rôle majeur dans la survenue de différentes pathologies à savoir la septicémie (Amezcuca Vesely *et al.*, 2012). Il a été démontré que suite à l'administration intrapéritonéale (i.p) du composant des bactéries gram négatives, les LPS chez des souris, les B1a du péritoine s'activent, migrent vers la rate et se différencient en IRA (Rauch *et al.*, 2012). En vue de déterminer si l'absence de Fzd6 affecte l'une des étapes importantes de fonctionnement des B1a en réponse à une infection bactérienne, nous avons comparé la réponse des souris Fzd6 KO et WT aux LPS injectés dans leurs péritoines. Notant que dans notre étude, nous avons utilisé un unique contrôle non-stimulé pour les souris injectées KO et WT puisqu'aucune différence n'a été observée entre les souris Fzd6 WT et KO à l'état normale. Tout d'abord, comme illustré dans la **Figure 4.2**, le suivi des signes cliniques des souris Fzd6 KO, Fzd6 WT injectées par les LPS (3 mg/kg) et des souris contrôles pendant 72 heures montre que les souris injectées ont perdu du poids par rapport aux souris non injectées. Cette perte de poids a été associée aux autres signes comme une mobilité réduite, dos courbé, yeux plus ou moins fermés, diarrhée et des poils dirigés vers le haut mais aucune différence significative n'a été observée entre les souris Fzd6 KO et WT injectées autant au niveau de perte de poids qu'au niveau des autres signes cliniques.



**Figure 4.2 L'impact de Fzd6 dans la perte de poids corporel post-stimulation par LPS**

Des souris femelles Fzd6 KO et Fzd WT ont reçu une seule injection intrapéritonéale de LPS à une dose de 3 mg/kg à temps 0 et leur poids corporel a été surveillé pendant 3 jours (6h, 24h 32h, 48h, 54h et 72h). La variation de poids mesuré par rapport au poids corporel initial a été exprimé et représenté en pourcentage. (N=4) (1 souris Fzd6 KO, 1 souris Fzd6 WT et 1 souris non injectée par expérience).

Étant donné que les souris WT et KO n'ont pas montré une différence dans les différents signes cliniques post-stimulation par LPS, nous étions intéressés à déterminer l'impact de la délétion de Fzd6 au niveau cellulaire. Les cellules prélevées, 3 jours post-stimulation, à partir de la rate, le péritoine et la moelle osseuse ont été marquées à la surface dans le but d'examiner si l'absence de Fzd6 affecte la réponse des B1a aux LPS injectés. La **Figure 4.3A** montre qu'il y a eu une apparition de la sous population IRA CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> CD43<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> VLA-4<sup>+</sup> LFA-1<sup>+</sup> au niveau de la rate 72 heures après injection i.p de LPS. En effet, les IRA Fzd6 KO sont plus présentes dans la rate (1,5% des LB totaux) par rapport aux IRA Fzd6 WT (1%), mais cette légère différence n'est pas statistiquement significative (p=0,1). En comparaison avec les souris contrôles non injectées (1,6 x 10<sup>5</sup> cellules), les résultats des analyses par cytométrie en flux (**Figure 4.3B**) montrent une augmentation, statistiquement non significative, du nombre des cellules IRA de 6 fois chez les souris WT (9,6 x 10<sup>5</sup> cellules) et presque 11 fois chez les souris KO (1,8 x 10<sup>6</sup> cellules) suite à l'exposition aux LPS. Idem pour les autres organes, aucune différence significative n'a été observée au niveau du péritoine et de la moelle osseuse (Données non présentées). Ceci suggère, donc, qu'en absence de Fzd6, il y'a une tendance à la hausse d'accumulation des cellules IRA au niveau de la rate.

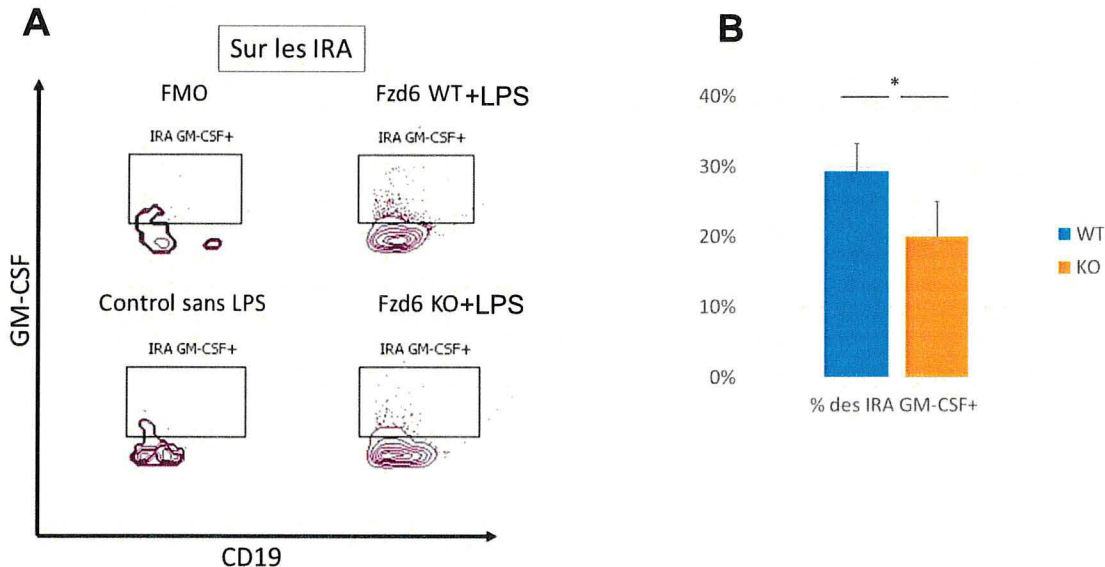


**Figure 4.3 Une tendance à la hausse du nombre de cellules IRA Fzd6 KO dans la rate *in vivo***

(A) Identification par cytométrie en flux des cellules IRA prélevées de la rate des souris Fzd6 KO, Fzd6 WT injectées par une seule dose i.p de LPS (3 mg/kg) (+LPS) et des souris non injectées qui servent comme contrôles (-LPS). La sélection des cellules IRA CD43<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> a été effectuée sur la population des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> LFA-1<sup>+</sup> VLA-4<sup>+</sup>. Les chiffres indiqués sur la figure représentent la moyenne des pourcentages des IRA calculés sur la population totale de lymphocytes B CD19<sup>+</sup>. (B) Quantification des cellules IRA obtenus de la rate des souris injectées et non injectées (Ni) par cytométrie en flux (Moyenne + SEM). (N=4, 1 souris Fzd6 KO et 1 souris Fzd6 WT et 1 souris non injectée/ expérience). Les souris sont âgées de 2-3 mois. n.s = non significatif \*p<0.05 (t-Test student) (les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

Une étude précédente a démontré qu'en cas de septicémie, le GM-CSF produit par les cellules IRA est utilisé d'une façon autocrine par ces cellules afin d'augmenter leur sécrétion des anticorps IgM naturels (Rauch *et al.*, 2012). Par conséquent, nous avons examiné également le rôle de Fzd6 dans la régulation de production de GM-CSF par les IRA suite à la stimulation par LPS *in vivo*. Afin de mesurer la production de GM-CSF, une énumération, par cytométrie en flux, des IRA CD19<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> qui produisent le GM-CSF (GM-CSF<sup>+</sup>) a été effectuée grâce au

marquage intracellulaire sur les cellules prélevées de la rate des souris Fzd6 KO et WT injectées par LPS. D'après nos résultats dans la **Figure 4.4A**, la stimulation par LPS a permis l'apparition de la population IRA productrice de GM-CSF chez les souris Fzd6 KO et aussi chez les souris Fzd6 WT. De plus, le nombre des cellules IRA GM-CSF<sup>+</sup> a été diminué de 30% chez les souris déficientes du gène *Fzd6* par rapport aux souris WT, suggérant ainsi que Fzd6 est impliqué dans le processus de production de GM-CSF par les IRA *in vivo* (**Figure 4.4B**).



**Figure 4.4** En absence de Fzd6 il y a moins des cellules IRA productrices de GM-CSF

(A) Les cellules ont été obtenues des rates des souris Fzd6 KO, Fzd6 WT 3 jours post-injection par une seule dose i.p de LPS (3 mg/kg) (+LPS) et des souris non injectées (control sans LPS), un contrôle FMO de GM-CSF (*Fluorescence Minus One*) a été fait avec des cellules stimulées par LPS afin d'éliminer les liaisons non spécifiques de l'anticorps qui cible le GM-CSF intracellulaire. La figure montre la stratégie d'identification des cellules IRA productrices de GM-CSF (CD19<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD93<sup>+</sup> GM-CSF<sup>+</sup>) par cytométrie en flux. (B) Énumération par cytométrie en flux des cellules IRA productrices de GM-CSF prélevées des rates des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT en réponse à l'injection par LPS (N=4, 1 souris Fzd6 KO, 1 souris Fzd6 WT/ expérience). Les souris sont âgées de 2-3 mois. n.s = non significatif \*p<0.05 (t-Test student pairé; les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

### 4.3 La protéine Fzd6 atténue l'accumulation des IRA et favorise la production de GM-CSF *In vitro*

Les B1a péritonéales sont les précurseurs principaux des cellules IRA et puisque, dans nos études *in vivo*, les souris utilisées précédemment comme notre modèle animal sont des souris Fzd6 KO dans toutes les cellules, nous avons voulu tester l'effet de la délétion de ce gène, spécifiquement, sur les B1a. Afin d'étudier la capacité de différenciation des B1a en IRA et afin d'investiguer si les résultats observés dans nos études *in vivo* viennent d'un phénomène



intrinsèque aux cellules B1a, un enrichissement de suspension cellulaire en B1a a été effectué. Cet enrichissement a été fait sur les cellules prélevées du péritoine par lavage péritonéale moyennant une sélection négative (**section 3.7**). Ensuite, en se basant sur un modèle *in vitro* (Rauch *et al.*, 2012), ces cellules ont été mises en culture pendant 48h dans un milieu de culture favorisant le développement des IRA. Premièrement, un test de pureté de la suspension cellulaire obtenue avant la mise en culture a été fait par cytométrie en flux et les résultats d'analyse (**Figure 4.5A**) montrent que le mélange final obtenu a été composé de 90% de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> dont plus que la moitié (59%) sont des cellules B1a CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD11b<sup>+/+</sup> et le reste est formé principalement des LB folliculaires et de LB1b. Ensuite, la capacité de différenciation des B1a en IRA a été examinée par cytométrie en flux tout en détectant et en dénombrant les cellules IRA présentes après la culture cellulaire des B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT à 37°C pendant 48 heures en présence de LPS (10 µg/mL). Les cellules IRA dans ces expériences ont été identifiées comme des LB CD19<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup> (**Figure 4.5B**). Les résultats des analyses obtenus montrent que la culture des B1a avec les LPS a induit la différenciation des cellules B1a en IRA chez les deux types de souris Fzd6 WT et Fzd6 KO tout en comparant avec le puit control où le LPS n'a pas été ajouté au milieu de culture (**Figure 4.5B**). Comme le montre la **Figure 4.5C**, en comparant la réponse des cellules Fzd6 KO et Fzd6 WT post-stimulation par LPS, le nombre des cellules IRA Fzd6 KO différenciées a été, considérablement, augmenté par rapport aux cellules Fzd6 WT où elles sont au nombre de  $2,17 \times 10^7$  cellules Fzd6 WT et  $3,60 \times 10^7$  cellules Fzd6 KO. Cette augmentation est significative en terme de pourcentage où les IRA Fzd6 KO forment 74% des LB totaux alors que les IRA Fzd6 WT en forment que 47% (**Figure 4.5D**). Ensemble, ces résultats qui s'accordent avec les résultats obtenus précédemment *in vivo*, montrent que les B1a Fzd6 KO se différencient plus facilement en IRA, ce qui suggère que la déficience en Fzd6 pourrait rendre les cellules B1a plus sensibles à la stimulation par LPS.

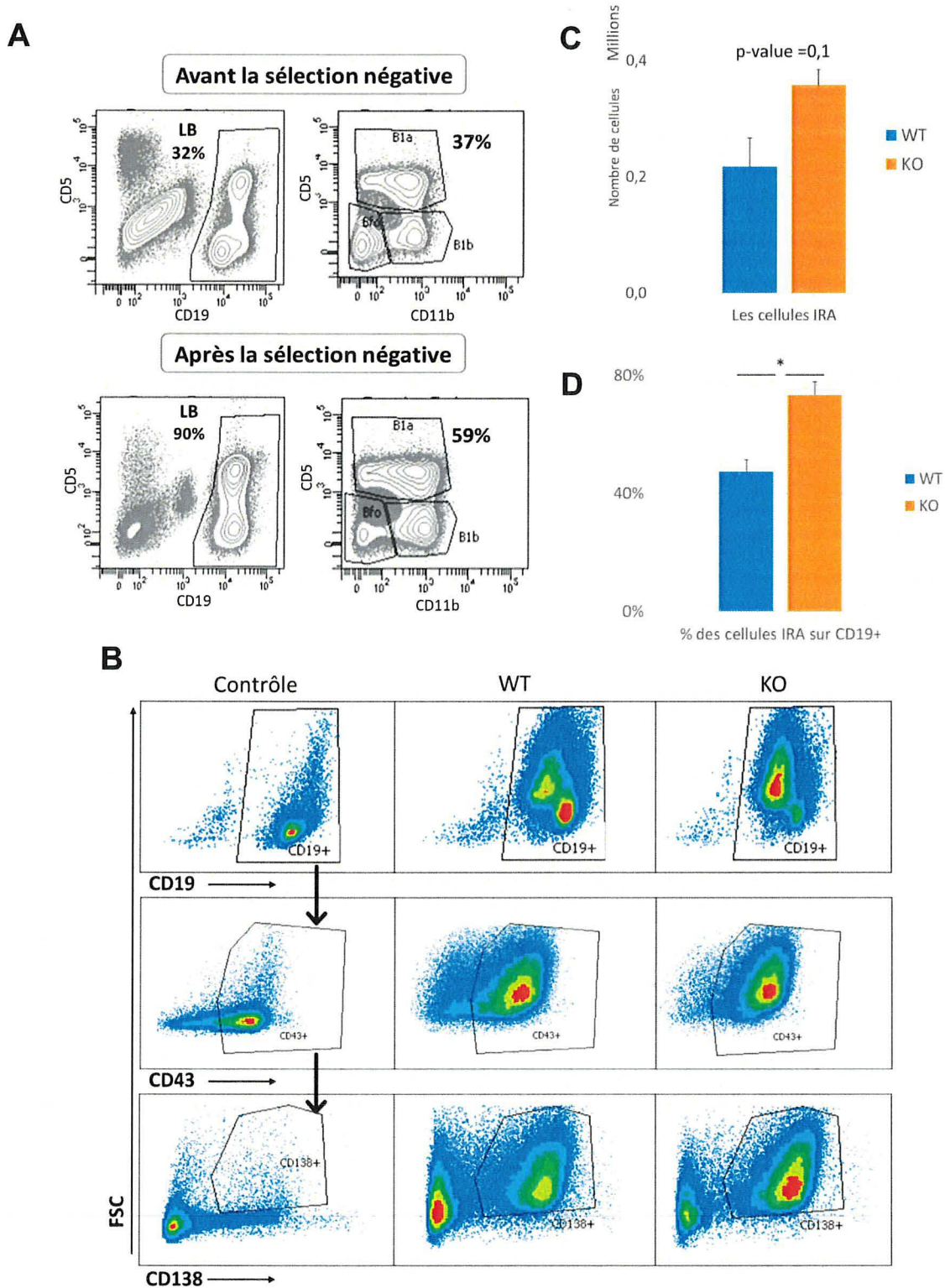
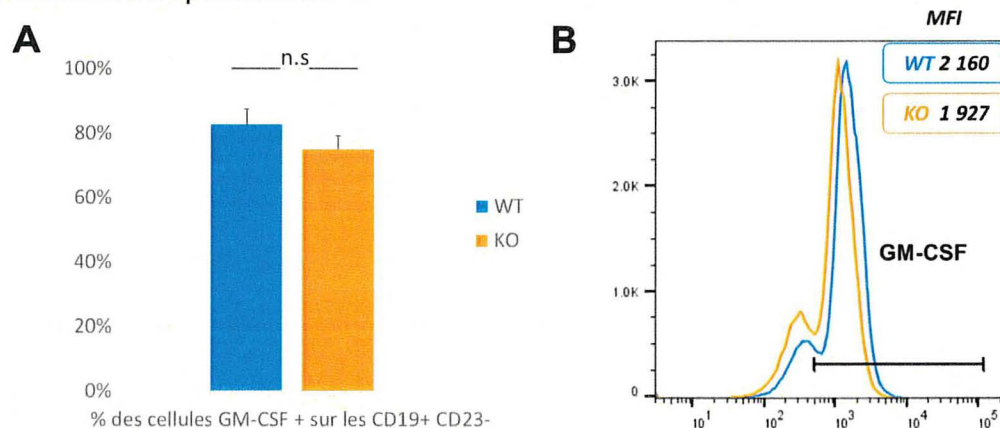


Figure 4.5 Les B1a Fzd6 KO sont plus sensibles à la stimulation par LPS *in vitro*

(A) Analyse par cytométrie en flux de la suspension cellulaire prélevée par lavage péritonéale des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT suite à un marquage extracellulaire. L'enrichissement a été fait par une sélection négative via des billes magnétiques tout en enlevant les cellules autres que les B1. A gauche, les pourcentages de LB

vivantes et à droite le pourcentage des B1a par rapport aux LB sélectionnés. B1a CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD11b<sup>+/-</sup> ; Bfo (LB folliculaires) CD19<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> ; B1b CD19<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>. En haut, analyse avant la sélection négative (identification des lymphocytes B (LB) CD19<sup>+</sup> et ensuite sélection des cellules B1a CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>), en bas après la sélection négative. (B) La stratégie d'identification des cellules IRA générées à partir des cellules B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT obtenues par sélection négative et placées en culture avec LPS (10 µg/mL) pour 48h. Le puit contrôle est un puit avec des cellules sans ajout de LPS. Les cellules IRA ont été identifiées par sélection des cellules CD19<sup>+</sup> puis CD43<sup>+</sup> et CD138<sup>+</sup> ; FSC « Forward scatter ». (C) Nombre absolu des cellules IRA générées à partir des B1a péritonéales Fzd6 KO et Fzd6 WT obtenues par sélection négative et qui ont été stimulées par LPS (D) et leurs pourcentages par rapport aux lymphocytes B totaux (CD19<sup>+</sup>). (N=3). \* p<0.05 (t-test student) (les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

La génération des IRA *in vitro*, nous a permis de tester de plus l'importance du gène *Fzd6* dans la production de GM-CSF par les IRA *in vitro*. Pour ce faire, des cellules enrichies en B1a péritonéales Fzd6 KO et WT ont été mises en culture en présence de LPS (10 µg/mL) pendant 48h à 37°C, puis, après avoir bloquer leur exocytose par Brefeldine A pendant 4 heures, elles ont été fixées et perméabilisées. Ensuite, un marquage intracellulaire a été effectué afin de déterminer la production de GM-CSF par les IRA obtenues des cellules B1a Fzd6 KO et WT différenciées. Les analyses des résultats obtenus par cytométrie en flux (**Figure 4.6A**), montre des pourcentages presque similaires des cellules IRA productrices de GM-CSF (GM-CSF<sup>+</sup>) suite au traitement avec LPS des B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT. Malgré l'absence de différence en terme de pourcentage des cellules IRA GM-CSF<sup>+</sup> sur les LB CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>, dans la **Figure 4.6B**, une légère diminution dans le taux de production par cellule de GM-CSF a été constatée au niveau des cellules IRA Fzd6 KO par rapport aux IRA Fzd6WT. Cette diminution a été observée dans trois expériences indépendantes.



**Figure 4.6** La protéine Fzd6 atténue l'accumulation des IRA

(A) Quantification par cytométrie en flux des cellules GM-CSF<sup>+</sup> générées en culture suite à la stimulation par LPS des B1a péritonéales Fzd6 KO et Fzd6 WT obtenues par sélection négative, représentée en pourcentage par rapport aux lymphocytes B non conventionnelles (CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>). (B) Profil d'expression de GM-CSF chez les cellules IRA générées *in vitro* 48heures post-stimulation par LPS (10 µg/mL) et après un marquage intracellulaire de GM-CSF. IRA Fzd6 KO (ligne orange) et Fzd6 WT (ligne bleu) ; MFI : « Mean Fluorescent Intensity » ou la moyenne de l'intensité de fluorescence. L'analyse est faite par Flowjo (N=3). \*p<0.05 (t-test student) (les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

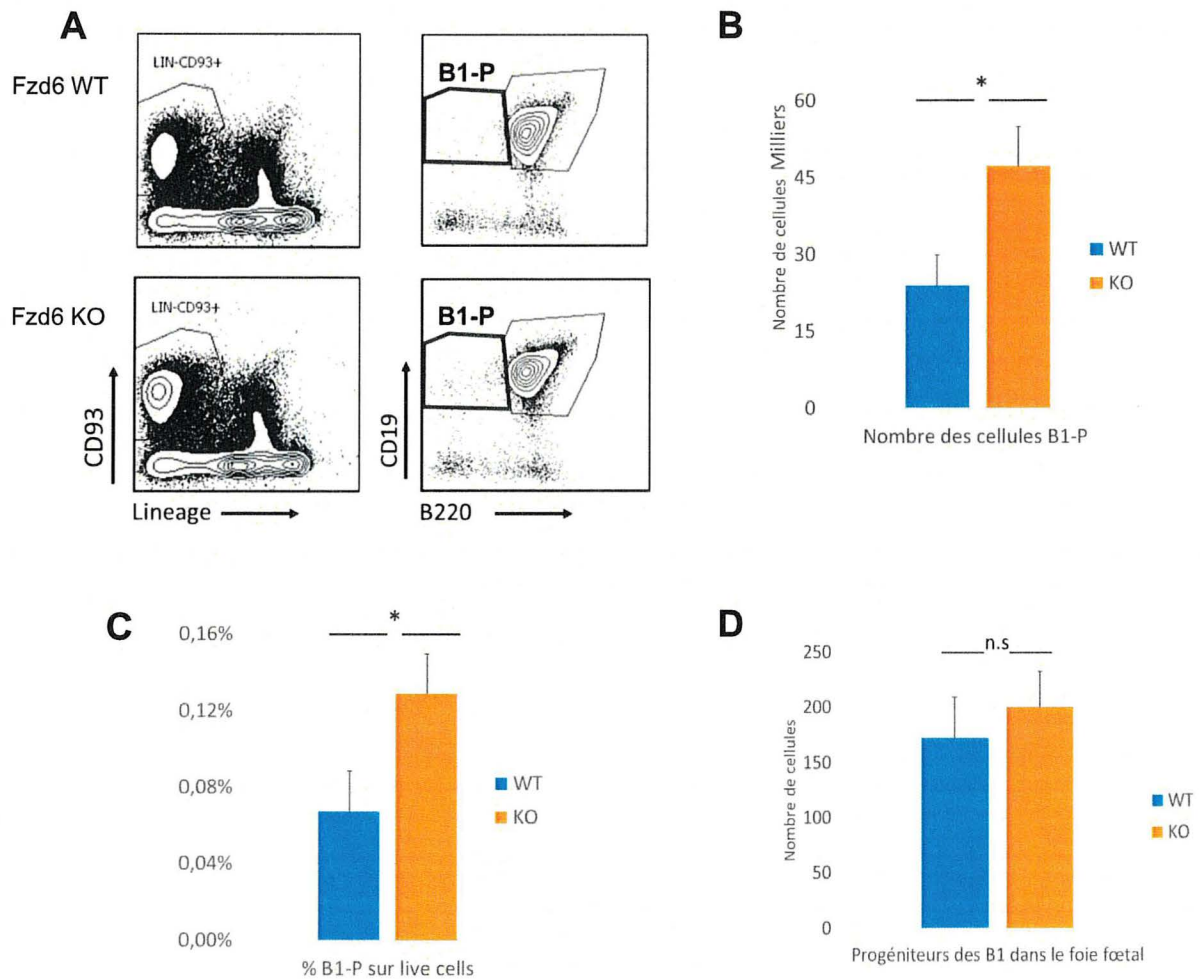
#### 4.4 L'absence de Frizzled6 induit l'expansion des progéniteurs B1 présents dans la moelle osseuse

Récemment, une étude a démontré que les voies de signalisation Wnt canonique et non canonique peuvent avoir un impact autant sur la prolifération et le maintien des B-1 péritonéales que sur la prolifération des progéniteurs B-1 (P-B1). En effet, l'activité Wnt canonique promeut la prolifération des cellules B-1 alors que les signaux Wnt non canoniques induisent l'expansion des précurseurs B-1 (Osugui *et al.*, 2018). En outre, il a été déjà rapporté que Fzd6 pourrait être un régulateur négatif autant de la voie calcique (Abidin *et al.*, 2015) que de la voie canonique (Golan *et al.*, 2004). Toutes ces données nous ont mené à investiguer le rôle de Fzd6 dans le développement des P-B1 à l'état normal. Pour ce faire, une analyse comparative par cytométrie en flux a été réalisée sur les cellules prélevées des moelles osseuses des souris Fzd6 WT et Fzd6 KO et marquées à la surface. Ainsi que d'autres anticorps mis pour sélectionner les P-B1, un mélange des anticorps biotinylés (qui se lie à la streptavidine) a été ajouté afin d'exclure tout autre type de cellules matures présent dans la suspension cellulaire. Le mélange d'anticorps désigné par « *Lineage* » (Lin) identifie les cellules positives pour les marqueurs suivants : CD3e (Lymphocytes T), GR1 (Granulocytes), CD11b (cellules myéloïdes), NK1.1 (*Natural killer*) et TER119 (Globules rouges). Donc, comme le montre la **Figure 4.7A**, les P-B1 ont été identifiés par cytométrie en flux comme des cellules Lin<sup>-</sup> CD93<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> B220<sup>-</sup>. D'une manière intéressante, les analyses statistiques ont montré que le nombre de cellules P-B1 a été beaucoup plus élevé au niveau de la moelle osseuse des souris Fzd6 KO en comparaison avec celle des souris Fzd6 WT, qui sont au nombre de 4,7 x 10<sup>6</sup> cellules et 2,4 x 10<sup>6</sup> cellules, respectivement (**Figure 4.7B**). De même le pourcentage des cellules P-B1 vivantes a été doublé, où il est passé de 0,06% chez les souris Fzd6 WT à 0,13% chez les souris Fzd6 KO (**Figure 4.7C**). Donc, cela démontre que l'absence de Fzd6 mène à l'expansion des précurseurs B1.

Étant donné qu'il a été démontré que les P-B1 se trouvent principalement durant la vie embryonnaire dans le foie fœtal, nous avons voulu déterminer si Fzd6 affecte le développement de ces précurseurs dès cette phase. Ainsi, les cellules obtenues des foies fœtaux des embryons de souris prélevées des souris gestantes, à 14-15 jours post-coïtum ont été analysées par cytométrie en flux suite à leur marquage extracellulaire avec les mêmes marqueurs décrits dans le paragraphe précédent. Aucune différence dans le nombre des précurseurs B-1 n'a été constaté chez les fœtus Fzd6 KO et Fzd6 WT (**Figure 4.7D**).

En résumé, nos résultats suggèrent que bien que Fzd6 n'ait pas d'effet sur les cellules B1a matures à l'état d'équilibre, son absence induit l'expansion des P-B1 chez des souris adultes.

En cas d'une stimulation par LPS, les cellules B1a Fzd6 KO ont tendance à se différencier plus en IRA et qui produisent moins de GM-CSF.



**Figure 4.7 Fzd6 contrôle l'expansion des progéniteurs B1 dans la moelle osseuse mais pas au niveau du foie foetal**

(A) Identification par cytométrie en flux des précurseurs B1 (P-B1) de la moelle osseuse dans des conditions homéostatiques. Tout d'abord, les cellules CD93<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> ont été sélectionnées ensuite, les P-B1 ont été définies comme CD19<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> en haut (Fzd6 WT) en bas (Fzd6 KO). (B) Enumération par cytométrie en flux des cellules P-B1 dans les moelles osseuses des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT et (C) détermination de leurs pourcentages par rapport aux cellules vivantes. (N=8). (D) Quantification des P-B1 dans les foies foetaux des fœtus Fzd6 KO et Fzd6 WT (N=4) \* p<0.05 (t-test student) (les barres d'erreurs sont représentées par SEM).

## 5 Discussion

---

Les cellules B1a appartiennent au type cellulaire des lymphocytes B1 qui représente une unique sous-population de lymphocytes B différente des lymphocytes B2 conventionnels. Elle est la population dominante dans les cavités péritonéale et pleurale et elle constitue la première ligne de défense contre les pathogènes en cas d'infection (Amezcuca Vesely *et al.*, 2012). Rauch *et al.*, ont montré qu'en réponse à une infection bactérienne au niveau du péritoine, la reconnaissance directe des pathogènes via la voie TLR4/Myd88, engendre l'activation des cellules B1a péritonéales, leur migration vers la rate où elles se différencient en cellules activatrices de la réponse innée « *Innate response activators* » (IRA). Ces dernières produisent GM-CSF qui est réutilisé d'une façon autocrine afin de produire, d'une manière plus abondante, des anticorps IgM naturels. Ces anticorps neutralisent l'antigène envahisseur, mais ils reconnaissent et éliminent également les cellules mortes (Grönwall *et al.*, 2012). Ceci permet la suppression de l'inflammation incontrôlée et de l'auto-immunité, d'où la protection contre la septicémie (Boes *et al.*, 1998; Rauch *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2014). En fait, il a été démontré que les signaux générés de la voie de signalisation Wnt/Fzd contrôlent différents mécanismes cellulaires au cours du développement embryonnaire (Huelsen *et al.*, 2000), pendant le développement du cancer (Giles *et al.*, 2003), dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Reya *et al.*, 2003), ainsi que dans le développement et la fonction des lymphocytes (Wu *et al.*, 2009). Un des composants de la voie de signalisation Wnt/Fzd est le récepteur transmembranaire Fzd6. Il s'est avéré que ce dernier est impliqué dans plusieurs processus cellulaires y compris, la migration des cellules cancéreuses du cancer du sein (Corda *et al.*, 2017), le développement de la LLC à partir des cellules B1a CD5<sup>+</sup> (Wu *et al.*, 2009) et la régulation du processus d'auto-renouvellement des CSH (Abidin *et al.*, 2015). Les lymphocytes B1a reflètent cette capacité des CSH pour se maintenir durant la vie adulte (Clarke *et al.*, 2018), et fait intéressant, le gène *Fzd6* est hautement exprimé chez les B1a de la cavité péritonéale mais son rôle est encore inconnu ([Immgen.org](http://Immgen.org)). Jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires qui régulent les différentes fonctions des cellules B1a, qui peuvent être une cible pour développer une thérapie potentielle contre la septicémie, sont encore peu connus et l'association entre les cellules B1a et la protéine Fzd6 est encore floue.

Devant toutes ces données, parmi les plusieurs questions qui émergent : comment les B1a se développent ? Quelle voie contrôle leur capacité d'auto-renouvellement, leur différenciation en IRA et leur fonction ? Quel rôle joue le gène hautement exprimé (*Fzd6*) dans ces cellules ? Donc,

afin d'élargir notre compréhension sur le maintien et le fonctionnement des cellules B1a, notre recherche consiste à élucider une partie de ces phénomènes, principalement, le rôle de Fzd6 dans ces cellules.

Dans la première partie, nous avons montré que le maintien des lymphocytes B innés « B1a », à l'état stationnaire, ne semble pas être affecté par l'absence de la protéine Frizzled6. Dans la deuxième partie et dans le but d'identifier le rôle de Fzd6 dans les B1a en réponse à une infection, nous avons choisi l'approche de l'analyse comparative entre des souris Fzd6 KO et WT injectées par LPS *in vivo* et par la suite en cultivant les cellules péritonéales enrichies en B1a en présence de LPS *in vitro*. Ainsi, nous avons observé qu'en présence de Fzd6 l'accumulation des IRA a été atténuée et la production de GM-CSF a été favorisée. Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l'étude de Fzd6 dans les progéniteurs B1, puisqu'une étude récente a indiqué que les cellules B1a matures et leurs progéniteurs répondent différemment à la voie de signalisation Wnt (Osugui *et al.*, 2018). Nos résultats ont montré que l'absence de Fzd6 induit l'expansion des progéniteurs B1 présents dans la moelle osseuse.

### **5.1 Frizzled6 n'a pas d'impact sur le maintien des cellules B1a dans les conditions homéostatiques**

Les premières preuves montrant la relation de Fzd6 avec les cellules B1a proviennent de l'observation d'une augmentation dramatique de l'expression du gène *Fzd6* dans les cellules B1a leucémiques du modèle murin de LLC et d'un retard de l'incidence de la LLC chez des souris modèles de LLC déficientes en Fzd6 (Wu *et al.*, 2009). Notre laboratoire a précédemment montré que Fzd6 joue un rôle essentiel dans le maintien et la survie des CSH en régulant leur processus d'auto-renouvellement (Abidin *et al.*, 2015). Ainsi, si Fzd6 est aussi essentiel pour le maintien des cellules B1a, son élimination pourrait entraîner un développement et un maintien moins efficaces de ces cellules. Cependant, notre étude comparative entre des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT a démontré que les nombres et les fréquences des B1a ont été comparables et aucune différence significative n'a été constatée dans les trois organes : la rate, la moelle osseuse et le péritoine dans des conditions homéostatiques. Ces résultats concordent avec des observations d'une étude qui a rapporté que l'évaluation, à l'état normale, du compartiment hématopoïétique des souris Fzd6 KO n'a montré aucune anomalie ni dans le nombre des cellules B1a CD5<sup>+</sup> (sans spécifier la provenance de ces cellules) ni dans le développement des différentes populations des lymphocytes B (immatures, folliculaires et de la zone marginale) (Wu *et al.*, 2009b). Dans notre étude, nous avons validé ces résultats et évalué l'effet de Fzd6 sur le développement des lymphocytes B tout en comparant les différentes sous-populations des précurseurs B dans la

moelle osseuse ( Fractions A, B-D, E et F) (Ellis *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 1991). Les résultats des fréquences obtenus par cytométrie en flux des différents précurseurs ont été similaires entre les souris Fzd6 KO et Fzd6 WT.

Ainsi, d'après nos données, Fzd6 ne semble pas être crucial pour le maintien des cellules B1a dans des conditions homéostatiques chez des jeunes souris. Cela suggère que, d'autres mécanismes pourraient être impliqués pour contrôler le maintien des cellules B1a. Récemment, une étude a montré que, à l'état normal, l'autophagie est exigée pour le développement des B1a. L'inhibition de ce mécanisme, qui est un mécanisme d'alimentation du métabolisme par dégradation des macromolécules et des organites cellulaires par les lysosomes, bloque l'auto-renouvellement des cellules B1a et engendre même une déficience sélective des lymphocytes B1a (Clarke *et al.*, 2018). Il a aussi été démontré que la déficience en  $\beta$ -caténine, un composant de la voie Wnt/Fzd, induit l'autophagie dans plusieurs cellules cancéreuses tels que la lignée cellulaire du cancer du sein (Fu *et al.*, 2014) et celle du myélome multiple (Su *et al.*, 2016) qui est caractérisé par une prolifération de plasmocytes dans la moelle osseuse (Sukhdeo *et al.*, 2007). En effet, afin de déterminer l'effet de Fzd6 sur le métabolisme cellulaire des B1a, une comparaison du profil d'expression des gènes métaboliques (impliqués dans la glycolyse, la synthèse, le stockage et le métabolisme des acides gras) pourrait être effectuée par la réaction en chaîne par polymérase à temps réel (RT-qPCR ou RNAseq) entre des cellules B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT triées par le trieur. Ensuite, en utilisant l'analyseur Seahorse, une analyse comparative de l'état métabolique pourrait être faite aussi sur des cellules B1a péritonéales Fzd6 KO et Fzd6 WT cultivées *in vitro* dans des conditions normales ou dans un état de stress induit par la mise en culture des B1a dans un milieu appauvri en nutriment ou en ajoutant de LPS. L'étude de l'activité métabolique cellulaire pourrait être effectuée indirectement, en mesurant le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) résultant de la production de lactate qui est un indicateur de la glycolyse et en mesurant le taux de consommation d'oxygène (OCR) pour quantifier la respiration mitochondriale/Phosphorylation oxydative (OXPHOS). Dans ce cas, si l'une des voies citées est inhibée cela suggère que Fzd6 pourrait y être impliqué (Plitzko & Loesgen, 2018). Plus encore, étant donné que le péritoine est riche en lipides, les cellules B1a acquièrent des lipides exogènes et les maintiennent comme réserves sous formes de gouttelettes lipidiques intracellulaire. L'inhibition de la synthèse des acides gras entraîne la mort cellulaire des B1a (Clarke *et al.*, 2018). Afin d'explorer le rôle de Fzd6 dans ce processus, une comparaison du stockage cytoplasmique de lipides pourrait être faite par comparaison de présence des lipides cytoplasmiques entre des cellules B1a Fzd6 KO et Fzd6 WT mises en culture. Ces gouttelettes lipidiques seront visualisées au microscope confocal ou quantifier par cytométrie en flux après



les avoir marquées par le colorant spécifique des lipides neutres, le 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentaméthyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacène (BODIPY 493/503).

## **5.2 L'absence du gène *Fzd6* entraîne une tendance à la hausse des cellules IRA et une diminution de production de GM-CSF par les IRA *in vivo***

Il a été établi que les cellules B1 péritonéales, responsables de la production d'anticorps naturels, offrent à l'organisme une protection contre un éventail d'antigènes tels que les composants des bactéries gram négatives, les LPS. En effet, en cas de septicémie, qui est une réaction inflammatoire systémique exagérée et potentiellement mortelle suite à une infection, il a été montré que l'ajout des lymphocytes B1a a amélioré la survie des souris Rag1 KO (déficientes en LT et en LB matures) affectées par la septicémie bactérienne en réduisant le milieu pro-inflammatoire créé grâce à leur fonction immunomodulatrice (Kelly-Scumpia *et al.*, 2011). D'ailleurs, la population des cellules IRA sécrétrices de GM-CSF et qui sont accumulées principalement dans la rate, divergent des cellules B1a péritonéales activées par la voie TLR4/Myd88 suite à une stimulation par LPS. De plus, afin d'étudier le rôle des IRA, des chercheurs ont produit des souris chimères déficientes en LB GM-CSF<sup>+</sup> « GM/μMT » avec la reconstitution des souris irradiées mortellement par un mélange de moelle osseuse déficiente en GM-CSF et en LB. Dans leur étude, il s'est avéré que, ces souris chimères montrent un taux de mortalité élevé par rapport aux souris contrôles (μMT/GM-CSF<sup>+</sup>) en réponse à une infection polymicrobienne provoquée par ponction et ligature caecale. Plus encore, la suppression spécifique de l'activité des cellules IRA altère l'élimination des bactéries et provoque un choc septique entraîné par un choc cytokinique (Rauch *et al.*, 2012). Bien que les cellules IRA possèdent un rôle protecteur contre la septicémie en sécrétant le GM-CSF qui est réutilisé d'une manière autocrine pour induire la sécrétion des IgM naturels, ces cellules sont l'une des principales sources de production d'IL-3. Cette dernière favorise la mobilisation des neutrophiles et la génération des monocytes inflammatoires dans la moelle osseuse (Boettcher *et al.*, 2012), qui induisent une sécrétion incontrôlée des cytokines inflammatoires (pro-IL-1b, IL-6 et *tumor necrosis factor-α* (TNFα)) par d'autres cellules et engendrent la myélopoïèse d'urgence (surproduction des cellules myéloïdes et de neutrophiles) (Chousterman & Swirski, 2015; Weber *et al.*, 2015). Notre laboratoire a déjà montré que *Fzd6* est nécessaire pour une réponse d'urgence des CSH efficace en cas d'une inflammation systémique. Cette étude a été effectuée par l'injection i.p des souris *Fzd6* KO et *Fzd6* WT avec une dose de LPS de 1 mg/kg deux fois à 48h d'intervalle (Abidin *et al.*, 2015). Étant donné que les cellules IRA jouent un rôle crucial dans la myélopoïèse d'urgence et pour déterminer une meilleure compréhension de l'impact de *Fzd6*

dans la complexe pathophysiologie septique, nous avons évalué la réponse des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT à une stimulation par les LPS. Des souris femelles ont été utilisées comme modèles murins puisqu'il a été rapporté qu'elles génèrent plus de cellules B1a et produisent plus d'anticorps naturels par rapport aux souris mâles (Zeng *et al.*, 2018). L'évaluation des symptômes cliniques 2 fois par jours pendant 3 jours des souris post-injection a montré que l'administration de LPS i.p a induit une perte de poids remarquable par rapport aux souris contrôles mais aucune différence significative n'a été détectée par rapport aux souris Fzd6 WT, autant sur la cinétique de la perte de poids qu'au niveau des scores cliniques. Dans nos expériences, une dose sous létale unique de LPS de 3 mg/kg a été utilisée, puisque parmi d'autres doses testées (0,3 mg/kg ; 1 mg/kg), seulement cette dose a permis l'observation des signes cliniques et la meilleure observation de la population IRA 72 heures post-injection en comparaison avec les souris non injectées. La population IRA a été presque absente dans les souris non injectées, ce qui est cohérent avec l'observation que les cellules IRA sont rarement présentes dans des conditions homéostatiques (Hilgendorf *et al.*, 2014). Bien que nos analyses par cytométrie en flux aient montré une tendance à la hausse du nombre et du pourcentage des cellules IRA dans la rate des souris Fzd6 KO, l'analyse statistique n'a pas montré de différences significatives. Il est possible que Fzd6 pourrait ne pas avoir un impact direct dans la réponse des souris Fzd6 WT et KO aux LPS. Dans ce cas, les résultats non significatifs obtenus pourraient être la conséquence des différents autres facteurs indéterminés. Ces derniers pourraient être dus aux variations inter-expériences obtenues, à la mauvaise réaction aux LPS d'une souris contrôle dans une parmi les quatre expériences, ou bien, vu les faibles différences entre les souris Fzd6 WT et KO, le nombre des souris utilisées pourrait être considéré comme trop petit. Une augmentation de notre cohorte pourrait être faite pour tester la solidité de nos résultats.

Dans la littérature, il a été démontré que, à l'état normal, parmi les autres organes, ce sont la moelle osseuse et la rate qui possèdent la majorité des cellules GM-CSF<sup>+</sup>, qui sont, normalement, les cellules non hématopoïétiques, les macrophages et, dans certains cas, les cellules T. Cependant, après stimulation par LPS et en cas de septicémie, les cellules IRA constituent la plus grande population sécrétrice de GM-CSF. Il a été rapporté que le GM-CSF induit la sécrétion d'IgM naturels par les IRA, d'où la génération d'un effet protecteur contre la septicémie (Rauch *et al.*, 2012). Un rôle possible pour le Fzd6 dans la fonction des IRA n'a pas été encore défini. Nos données obtenues par cytométrie en flux ont montré que le nombre des cellules IRA GM-CSF<sup>+</sup> a été réduit chez les souris Fzd6 KO. En effet, il a été rapporté aussi qu'en cas de septicémie, les IRA peuvent avoir un rôle amplificateur d'inflammation en induisant la myélopoïèse d'urgence par leur sécrétion de l'IL-3. Plus encore, les souris déficientes en

GM-CSF ont accumulé des cellules IRA productrices d'IL-3 tandis que les souris déficientes en IL-3 ont accumulé des cellules IRA productrices de GM-CSF (Weber *et al.*, 2015). Donc, nous pourrions penser que la diminution des cellules IRA productrices de GM-CSF dans les souris Fzd6 KO pourrait être remplacée par une production des IRA sécrétrices d'IL-3. Afin de tester cette hypothèse, une mesure de la production de l'IL-3 par un test ELISA « *enzyme-linked immunosorbent assay* » et l'énumération des cellules IL-3<sup>+</sup> ainsi que la production d'IgM par ELISPOT « *enzyme-linked immunospot* » pourraient être effectués chez les souris Fzd6 KO et WT.

Dans notre laboratoire, il a été montré que la déficience en Fzd6, dans un modèle de myélopoïèse d'urgence, engendre une réponse réduite de ce phénomène due à la génération d'un environnement plus inflammatoire causant la mort rapide et accrue des cellules par nécroptose (Nguyen, Abidin & Heinonen ; manuscrit en révision). Les souris dans cette étude ont été injectées 2 fois par LPS à 1 mg/kg où la deuxième injection a été faite après 48 heures. Notant que la différence dans la réponse des souris Fzd6 WT et KO dans ce modèle a été observée surtout après la deuxième injection, il pourrait ainsi être intéressant de comparer la réponse de nos souris Fzd6 KO et Fzd6 WT aux LPS (les signes cliniques, l'énumération des cellules IRA) dans les deux différents modèles, à une seule dose à 3 mg/kg et celui à deux injections à 1 mg/kg à différents moments post-injection.

### **5.3 La protéine Fzd6 atténue l'accumulation des IRA et favorise la production de GM-CSF *In vitro***

Il convient de préciser que, dans notre modèle murin utilisé *in vivo*, la déficience en Fzd6 affecte toutes les cellules. Ainsi, dans le but d'étudier l'effet de la délétion de Fzd6 spécifiquement sur les B1a et d'examiner si nos observations *in vivo* ont été intrinsèques à ces cellules, nous avons eu recours à la comparaison de la réponse des cellules B1a péritonéales Fzd6 KO et WT mises en culture *in vitro* à la stimulation par LPS (à 10 µg/mL) (Rauch *et al.*, 2012). Conformément à nos observations *in vivo*, nos résultats *in vitro* ont démontré que les cellules B1a péritonéales Fzd6 KO ont tendance à générer plus de cellules IRA. La différence a été significative en termes de pourcentage mais les cellules IRA Fzd6 KO ont juste montré une tendance à la hausse en termes de nombre cellulaire. En excluant l'idée que Fzd6 n'a pas d'impact sur la différenciation des B1a, nous pouvons penser que cette hausse non significative pourrait être due aux différentes variations dans le système de culture entre les expériences. Ou bien, elle pourrait être due également à une différenciation plus rapide des cellules B1a Fzd6 KO, avec soit, plus de mortalité ou moins de prolifération. D'ailleurs, dans ce cas, nos données *in vitro* se sont révélées

corrélées à nos résultats *in vivo* où les cellules B1a Fzd6 KO semblent être plus sensibles et plus susceptibles à la stimulation par LPS par rapport aux Fzd6 WT. En effet, nos analyses par cytométrie en flux des cellules obtenus après 48h de culture ont montré que les cellules CD19<sup>+</sup> Fzd6 KO possédaient une taille plus grande par rapport aux cellules contrôles (**Figure 4.5**). Et comme mentionné précédemment, les cellules B1a sont plus actives métaboliquement (Clarke *et al.*, 2018), cela suggère que l'absence de Fzd6 rend les cellules B1a Fzd6 KO plus sensibles aux LPS. Auparavant, il a été démontré que la génération des cellules IRA a été induite par la reconnaissance des LPS via les récepteurs TLR4 présents sur les cellules B1a (Xu *et al.*, 2015). Mettant l'hypothèse que lors de l'administration de LPS les cellules B1a Fzd6 KO ont généré une réponse plus rapide par rapport aux cellules contrôles, une analyse comparative de l'expression du récepteur TLR4 à la surface des cellules B1a Fzd6 KO et WT ainsi que certains composants en aval de TLR4 pourrait être effectuée. Compte tenu que différents mécanismes pourraient être impliqués pour influencer le taux de production cellulaire, plusieurs questions se posent sur l'augmentation de production des cellules IRA Fzd6 KO. Est-ce que cette augmentation est due au fait que les cellules B1a Fzd6 se mobilisent plus ? est-ce qu'elles se différencient plus ? ou bien elles prolifèrent plus ? À cet égard, davantage d'études pourraient être effectuées pour répondre à ces questions. En effet, une comparaison de la survie cellulaire des cellules IRA Fzd6 KO et Fzd6 WT pourrait être faite moyennant le marqueur conjugué « Annexin V » qui se fixe sur la phosphatidylsérine exposée sur les cellules apoptotiques. En addition, le marqueur 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) qui est un nucléoside analogue à la thymidine qui en s'incorporant dans l'ADN lors de la division cellulaire pourrait servir comme marqueur pour tester et comparer le potentiel prolifératif cellulaire en absence et en présence de Fzd6.

Le GM-CSF est une cytokine qui influence la génération, la maturation, la fonction et la survie de ses cellules cibles (Xu *et al.*, 2015). Dans le cas de septicémie, l'ajout du GM-CSF a été bénéfique mais il est possible que d'autres cellules participent à la protection contre la septicémie (Rauch *et al.*, 2012). Ici, l'étude de l'impact de la délétion du gène *Fzd6* sur la production de GM-CSF spécifiquement par les IRA induites par le LPS a été effectuée par marquage intracellulaire des IRA positives pour le GM-CSF après avoir bloqué son exocytose. En effet, nous avons constaté que le nombre des cellules IRA productrices de GM-CSF a été comparable chez les deux types de cellules Fzd6 KO et WT *in vitro* mais une diminution de production de GM-CSF par cellules a été détectée chez les IRA Fzd6 KO. Ces observations indiquent que malgré la présence d'un plus grand nombre des IRA Fzd6 KO, la production de GM-CSF par cellule a été diminuée en absence de Fzd6. Le GM-CSF possède un rôle protecteur contre l'infection bactérienne (Shiomi *et al.*,

2016). Pour déterminer si la diminution de production de GM-CSF par les IRA a été due, du fait que, les B1a Fzd6 KO ont été biaisés vers le phénotype non protecteur IL-3<sup>+</sup>, il aurait été intéressant, d'évaluer, ainsi que le GM-CSF, la production des anticorps naturels IgM et d'IL-3 chez les IRA Fzd6 KO et Fzd6 WT. Cela pourrait nous informer si la déficience de Fzd6 affecte la capacité protectrice des cellules IRA en cas de septicémie en les rendant plus inflammatoires ou non.

L'obtention d'un plus grand nombre de cellules IRA Fzd6 KO *in vitro* convient avec nos résultats *in vivo*, suggérant ainsi que les B1a sont plus susceptibles à répondre aux LPS, cependant, la diminution du pourcentage des cellules IRA GM-CSF<sup>+</sup> obtenue *in vivo* n'a pas été observée *in vitro*. Les différences pourraient être attribuées à des différences subtiles, y compris, essentiellement, les conditions physiologiques qui ont été absentes dans notre approche *in vitro*. Rappelant que, malgré l'accumulation d'un plus grand nombre des IRA dans la rate des souris Fzd6 KO injectées par LPS *in vivo*, aucune différence dans les signes cliniques n'a été notée en comparaison avec les souris contrôles injectées. Cela suggère que l'environnement physiologique probablement a influencé la fonction des cellules IRA. De plus, comme mentionné plus haut, les cellules du modèle murin utilisé dans nos études ont été toutes déficientes en Fzd6. Collectivement et afin de mettre en évidence l'effet intrinsèque de Fzd6 dans la différenciation des B1a et dans la fonction des IRA dans des conditions physiologiques, un transfert adoptif des cellules B1a Fzd6 WT et B1a Fzd6 KO dans des souris receveuses déficientes en B1a pourrait être effectué. Les souris CD19<sup>-/-</sup> représentent un bon modèle de souris receveuses, puisque la déficience en CD19 a altéré le développement des lymphocytes B y compris les cellules B1a ainsi que la production d'anticorps naturels protecteurs (Haas *et al.*, 2005). Bien que nous ayons réussi à obtenir une bonne population de IRA avec injection de LPS, il serait intéressant de faire l'étude avec un modèle plus physiologique qui est le modèle polymicrobien de sepsis (par ponction et ligature caecale) afin d'évaluer notre hypothèse que les cellules IRA Fzd6 KO pourraient moins protéger contre la septicémie.

#### **5.4 L'absence de Frizzled6 induit l'expansion des progéniteurs B1 présents dans la moelle osseuse**

Récemment, une étude a montré que les progéniteurs B1 et les cellules B1 matures répondent différemment à la signalisation Wnt. Il a été rapporté que le ligand canonique de la voie Wnt (Wnt3a) a favorisé la prolifération des cellules matures B-1, tandis que le signal non canonique (Wnt5a) a induit l'expansion des précurseurs B-1 (Osugui *et al.*, 2018). Malgré que Fzd6 semble ne pas avoir un rôle sur le maintien des B1a matures à l'état normale, il reste possible qu'il puisse

jouer un rôle dans le développement et le maintien des progéniteurs B1 (P-B1). Afin de mettre en exergue l'impact de Fzd6 chez les P-B1, tout d'abord une comparaison du taux de ces progéniteurs dans la moelle osseuse des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT a été effectuée. Fait intéressant, nous avons démontré que l'absence de Fzd6 a induit l'expansion des P-B1, étant donné que leur nombre a été plus élevé dans la moelle osseuse des souris Fzd6 KO par rapport aux souris contrôles. Il a été décrit, auparavant, que le foie fœtal constitue un site majeur contenant des cellules progénitrices, y compris les précurseurs B-1 (Kobayashi *et al.*, 2014). Contrairement à nos résultats obtenus à partir de la moelle osseuse, aucune différence significative n'a été notée dans le taux des précurseurs B-1 issus des foies fœtaux des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT. Dans une étude précédente, il a été suggéré que l'expression de Wnt5a par les cellules stromales hébergeant la moelle osseuse pourrait soutenir le maintien des progéniteurs B1 (Reya *et al.*, 2000). Cependant, les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse adulte et fœtale présentent un aspect différent de la voie Wnt. Par conséquent, le microenvironnement différent pourrait expliquer la non-similarité des résultats obtenus des P-B1 dérivés de la moelle osseuse et du foie fœtal. Comme mentionné plus haut, une expansion marquée des P-B1 a été observée en présence du ligand Wnt5a (Osugui *et al.*, 2018). Étant donné que dans notre modèle murin, toutes les cellules ont été déficientes en Fzd6, le plus grand nombre des P-B1 observé en absence de Fzd6 pourrait être dû à une perturbation dans la balance d'expression des ligands Wnt dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Afin d'examiner l'effet intrinsèque de l'absence de Fzd6 sur les P-B1, une mise en culture *in vitro* des P-B1 triés des moelles osseuses des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT dans les mêmes conditions favorisant leur maintien pourrait être faite. Notant qu'il a été rapporté que le ligand Wnt3a permet d'induire la génération des B1a à partir des P-B1 et favorise la prolifération des B1 *in vitro* (Osugui *et al.*, 2018). De plus, la contribution des P-B1 à l'état normal dans l'organisme est encore peu connue. Ainsi, il serait intéressant de tester si l'absence du récepteur de la voie de signalisation Wnt, Fzd6, affecte la capacité d'expansion des P-B1 en réponse au ligand Wnt5a et si les P-B1 Fzd6 KO seront capables de générer des B1a matures autant que les P-B1 Fzd6 WT par l'ajout de Wnt3a dans le milieu de culture. En addition, le ligand non canonique Wnt5a a été identifié comme un inducteur de la voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> (Liang *et al.*, 2003; Malhotra *et al.*, 2008) et des résultats de notre laboratoire suggèrent que cette voie pourrait être suractivée, dans les CSH, en absence du gène *Fzd6*. En se basant sur ces données et avec l'hypothèse que Fzd6 est un récepteur antagoniste aux signaux Wnt5a, nous nous attendrions à une expansion encore plus élevée des P-B1 Fzd6 KO en présence de Wnt5a par rapport aux P-B1 Fzd6 WT.

Dans cette partie de notre projet, nous avons démontré que Fzd6 est clairement impliqué dans la régulation de l'expansion des P-B1 à l'état d'équilibre. Dans la première partie de notre étude, nos résultats ont montré que le taux des cellules B1a dans les différents organes des souris Fzd6 KO et Fzd6 WT a été comparable dans des conditions homéostatiques. En outre, il a été rapporté que les B1a sont plus résistants à l'apoptose induite par des irradiations sub-létales et même létales en comparant avec les LB conventionnels (Aziz *et al.*, 2017; Guimarães-Cunha *et al.*, 2016; Otero *et al.*, 2006). Collectivement, il est donc possible de suggérer que l'absence de Fzd6 a rendu les B1a plus sensibles à l'apoptose ce qui pourrait engendrer leur mort rapide, d'où la sur-activation de la voie régulant l'expansion des P-B1 pour compenser la perte de cellules B1a péritonéales tout en gardant un taux basal. D'autre part, il a été rapporté que FZD6 humain supprime la prolifération et la migration des cellules cancéreuses dans le cancer gastrique (Yan *et al.*, 2016) et il induit les métastases et l'invasion des cellules cancéreuses dans le cancer du sein (Corda *et al.*, 2017). Plus encore, certaines études suggèrent aussi l'implication du Fzd6 dans la migration cellulaire durant l'organogenèse (Corda & Sala, 2017). Donc, ceci nous mène à penser que l'accumulation des P-B1 dans la moelle osseuse des souris Fzd6 KO pourrait être, également, la conséquence d'une production plus importante des progéniteurs dans le foie foetal suivie d'une migration cellulaire plus élevée vers la moelle osseuse des souris Fzd6 KO, ce qui explique l'observation du même taux des P-B1 dans le foie foetal avec un taux élevé de P-B1 Fzd6 KO dans la moelle osseuse.

En conclusion, nos résultats dans cette étude ont permis d'ouvrir une nouvelle voie dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien et la fonction des cellules B1a, ce qui pourraient conduire à de nouvelles perspectives thérapeutiques contre des maladies cancéreuses et infectieuses telles que la LLC et la septicémie. Par exemple, afin d'améliorer la réponse immunitaire contre une infection comme la septicémie, le développement d'une thérapie basée sur l'injection d'une préparation des Ig contenant une concentration bien déterminée d'IgM naturels poly-réactifs (sans créer des effets secondaires) chez des patients malades pourrait être efficace. Plus encore, elle pourrait être utilisée comme une thérapie complémentaire chez des patients qui ont déjà subi un traitement immunosuppresseur. De plus, puisque les LB CD5+ secrètent de l'IL-10, ce dernier pourrait s'avérer utile dans de thérapies cliniques telles que le traitement du rejet d'allogreffe et de certaines maladies auto-immunes.

## 6 CONCLUSION

---

Notre projet visait à déterminer le rôle de Fzd6 dans les cellules B1a. Dans la première partie, nous avons montré que Fzd6 ne semble pas être impliqué dans les processus régulant le maintien et le développement des cellules B1a à l'état d'équilibre. Et cela est conclu puisque les nombres et les fréquences des cellules B1a sont comparables entre les jeunes souris Fzd6 WT et KO dans la moelle osseuse, la rate et le péritoine (**Figure 6.1**).

Dans la deuxième partie de ce travail et dans le but d'identifier le rôle de Fzd6 dans les B1a en réponse à une infection, nous avons choisi l'approche de l'analyse comparative entre des souris Fzd6 KO et WT injectées par LPS *in vivo*. Ainsi, nous avons montré qu'en présence de Fzd6 l'accumulation des IRA a été atténuée et leur production de GM-CSF a été favorisée. En effet, bien que les souris injectées perdent du poids par rapport aux souris contrôles, les souris Fzd6 WT et KO montrent des scores cliniques comparables. En revanche, une accumulation des cellules IRA a été observée dans la rate des souris déficientes en Fzd6 trois jours post-infection associée à une présence plus réduite de cellules IRA GM-CSF<sup>+</sup>. Nous avons démontré également une tendance à la hausse de production de cellules IRA à partir des B1a péritonéales Fzd6 KO cultivées en présence de LPS associée à une diminution de production de GM-CSF par ces IRA *in vitro*. Effectivement, dans les deux cas précédents nous avons démontré que les cellules B1a Fzd6 KO semblent être plus sensibles et plus susceptibles à la stimulation par LPS par rapport aux Fzd6 WT.

Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l'effet de Fzd6 dans un état précoce où nous avons voulu mettre en exergue le rôle de Fzd6 dans le développement et le maintien des progéniteurs B1 issus de la moelle osseuse et des foies fœtaux. Toutefois, nous avons montré que l'absence de Fzd6 induit l'expansion des progéniteurs B1 seulement dans la moelle osseuse puisqu'aucune différence n'a été notée dans les progéniteurs B1 des fœtus Fzd6 WT et KO.

En conclusion, l'absence de la protéine Fzd6 semble favoriser la mobilisation des lymphocytes B1a et leur différenciation en IRA en cas d'une infection sans affecter leur maintien à l'état normal. En revanche, d'autres études et des travaux restent à être faits pour déterminer à quel niveau ce récepteur est impliqué. Et conséquemment, les résultats pourraient ainsi servir à développer des outils technologiques et thérapeutiques contre les pathologies où les cellules B1a et son récepteurs Fzd6 sont impliqués.



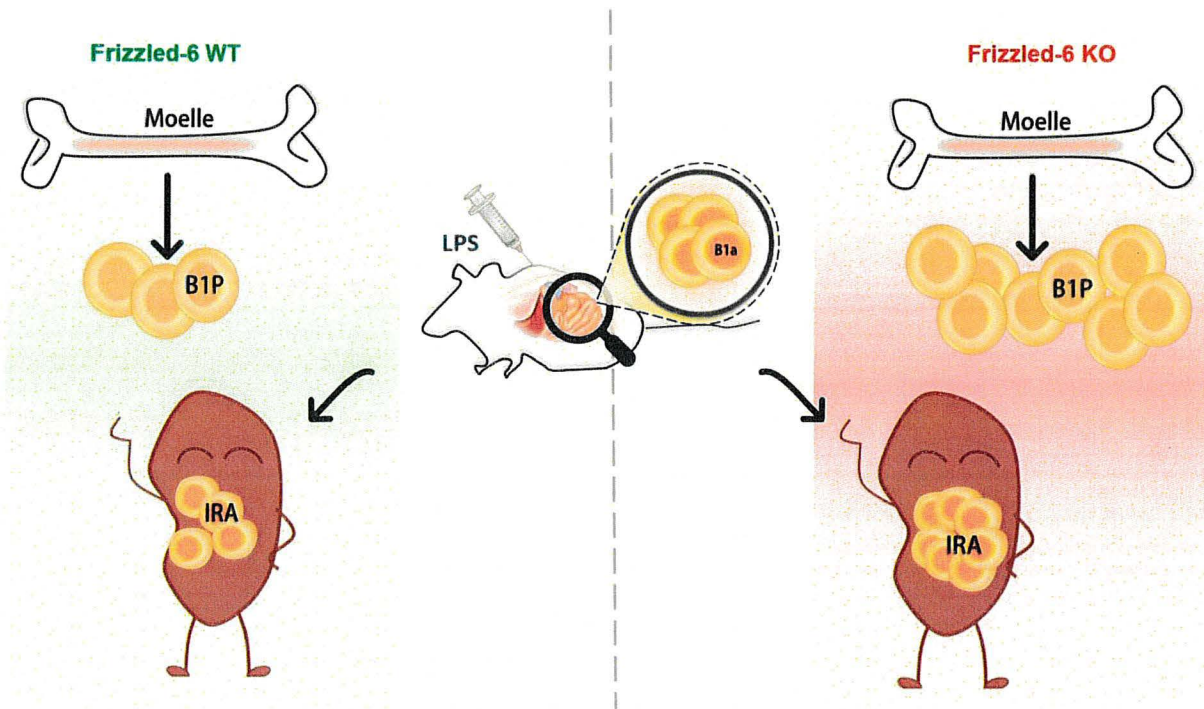


Figure 6.1 Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans notre présente étude

À l'état normal, l'absence de Fzd6 induit l'expansion des progéniteurs B1 mais n'affecte pas le maintien des B1a matures. Dans le cas d'une stimulation par LPS, la déficience en Fzd6 induit une plus grande accumulation de cellules IRA au niveau de la rate associée à une diminution de production de GM CSF.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

---

- Abidin BM, Owusu Kwarteng E & Heinonen KM (2015) Frizzled-6 Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Survival and Self-Renewal. *The Journal of Immunology* 195(5):2168-2176.
- Adler PN, Charlton J & Vinson C (1987) Allelic variation at the frizzled locus of *Drosophila*. *Developmental genetics* 8(2):99-119.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Alugupalli KR, Gerstein RM, Chen J, Szomolanyi-Tsuda E, Woodland RT & Leong JM (2003) The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *The Journal of Immunology* 170(7):3819-3827.
- Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T & Gerstein RM (2004) B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21(3):379-390.
- Amezcuca Vesely MC, Schwartz M, Bermejo DA, Montes CL, Cautivo KM, Kalergis AM, Rawlings DJ, Acosta-Rodríguez EV & Gruppi A (2012) FcγRIIb and BAFF differentially regulate peritoneal B1 cell survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(10):4792-4800.
- Ansel KM, Harris RBS & Cyster JG (2002) CXCL13 Is Required for B1 Cell Homing, Natural Antibody Production, and Body Cavity Immunity. *Immunity* 16(1):67-76.
- Arleevskaya MI, Larionova RV, Brooks WH, Bettacchioli E & Renaudineau Y (2020) Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 58(2):172-181.
- Axelrod JD (2020) Planar cell polarity signaling in the development of left–right asymmetry. *Current Opinion in Cell Biology* 62:61-69.
- Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL & Wang P (2015) The role of B-1 cells in inflammation. *Immunologic Research* 63(1):153-166.
- Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL & Wang P (2017) B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. *The Journal of Immunology* 199(2):750-760.
- Baba Y, Garrett KP & Kincade PW (2005) Constitutively active beta-catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity* 23(6):599-609.
- Banchereau J & Rousset F (1992) Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Advances in immunology* 52:125-262.
- Barber CL, Montecino-Rodriguez E & Dorshkind K (2011) Reduced production of B-1–specified common lymphoid progenitors results in diminished potential of adult marrow to generate B-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(33):13700-13704.
- Baumgarth N (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology* 11(1):34.
- Baumgarth N (2013) Innate-like B cells and their rules of engagement. *Crossroads Between Innate and Adaptive Immunity IV*, Springer. p 57-66.
- Baumgarth N (2017) A hard (y) look at B-1 cell development and function. *The Journal of Immunology* 199(10):3387-3394.

- Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA & Chen J (2000) B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 192(2):271-280.
- Bemark M (2015) Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res* 29(4):264-284.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Trepo C, Hainaut P, Scoazec JY, Vitvitski L & Merle P (2008) Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 99(1):143-150.
- Berland R & Wortis HH (2002) Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annual review of immunology* 20(1):253-300.
- Berthelot J-M, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y & Youinou P (2012) Les lymphocytes B régulateurs: des acteurs majeurs de l'équilibre immunitaire. *Revue du rhumatisme* 79(5):382-386.
- Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, Russo G, Hardy RR & Croce CM (2002) Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):6955-6960.
- Bienz M & Clevers H (2003) Armadillo/ $\beta$ -catenin signals in the nucleus – proof beyond a reasonable doubt? *Nature Cell Biology* 5(3):179-182.
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC & Chen J (1998) A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection. *The Journal of Experimental Medicine* 188(12):2381-2386.
- Boettcher S, Ziegler P, Schmid MA, Takizawa H, van Rooijen N, Kopf M, Heikenwalder M & Manz MG (2012) Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(12):5824-5828.
- Borriello F, Galdiero MR, Varricchi G, Loffredo S, Spadaro G & Marone G (2019) Innate Immune Modulation by GM-CSF and IL-3 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 20(4):834.
- Bouaziz J-D, de Masson A, Le Buanec H, Bagot M & Bensussan A (2014) Lymphocytes B régulateurs: état des connaissances. *médecine/sciences* 30(8-9):721-724.
- Boumsell L, Bernard A, Lepage V, Degos L, Lemerle J & Dausset J (1978) Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *European Journal of Immunology* 8(12):900-904.
- Bröker K, Figge J, Magnusen AF, Manz RA, Köhl J & Karsten CM (2018) A Novel Role for C5a in B-1 Cell Homeostasis. *Front Immunol* 9:258.
- Caldwell GM, Jones CE, Soon Y, Warrack R, Morton DG & Matthews GM (2008) Reorganisation of Wnt-response pathways in colorectal tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 98(8):1437-1442.
- Cantilena S, Pastorino F, Chayka O, Pezzolo A, Pistoia V, Ponzoni M & Sala A (2011) Frizzled receptor 6 marks rare, highly tumorigenic stem-like cells in mouse and human neuroblastomas. *Oncotarget* 2(12).
- Castañeda-Sánchez JI, Duarte ARM, Domínguez-López ML, de la Cruz-López JJ & Luna-Herrera J (2017) B Lymphocyte as a Target of Bacterial Infections. *Lymphocyte Updates: Cancer, Autoimmunity and Infection* :149.

- Chan S, Karpf D, Fowlkes M, Hooks M, Bradley M, Vuong V, Bambino T, Liu M, Arnaud C & Strewler G (1992) Two homologs of the Drosophila polarity gene frizzled (fz) are widely expressed in mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry* 267(35):25202-25207.
- Chang H, Smallwood PM, Williams J & Nathans J (2016) The spatio-temporal domains of Frizzled6 action in planar polarity control of hair follicle orientation. *Developmental Biology* 409(1):181-193.
- Charles A, Janeway J & Medzhitov R (2002) Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20(1):197-216.
- Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T, Vink CS, Bhandoola A, Dzierzak E & Speck NA (2011) Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* 9(6):541-552.
- Chin SS, Chorro L, Chan J & Lauvau G (2019) Splenic Innate B1 B Cell Plasmablasts Produce Sustained Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Cytokines during Murine Malaria Infections. *Infection and Immunity* 87(12):e00482-00419.
- Choi K (2002) The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *Journal of hematology & stem cell research* 11(1):91-101.
- Choi YS & Baumgarth N (2008) Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* 205(13):3053-3064.
- Chousterman BG & Swirski FK (2015) Innate response activator B cells: origins and functions. *International Immunology* 27(10):537-541.
- Clarke AJ, Riffelmacher T, Braas D, Cornall RJ & Simon AK (2018) B1a B cells require autophagy for metabolic homeostasis and self-renewal. *Journal of Experimental Medicine* 215(2):399-413.
- Consortium TU (2018) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* 47(D1):D506-D515.
- Cooper MD & Alder MN (2006) The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell* 124(4):815-822.
- Copp AJ & Greene ND (2010) Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* 220(2):217-230.
- Corda G & Sala A (2017) Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis* 6:e364.
- Corda G, Sala G, Lattanzio R, Iezzi M, Sallese M, Fragassi G, Lamolinara A, Mirza H, Barcaroli D, Ermler S, Silva E, Yasaei H, Newbold RF, Vagnarelli P, Mottolese M, Natali PG, Perracchio L, Quist J, Grigoriadis A, Marra P, Tutt AN, Piantelli M, Iacobelli S, De Laurenzi V & Sala A (2017) Functional and prognostic significance of the genomic amplification of frizzled 6 (FZD6) in breast cancer. *J Pathol* 241(3):350-361.
- Cui C-Y, Klar J, Georgii-Heming P, Fröjmark A-S, Baig SM, Schlessinger D & Dahl N (2013) Frizzled6 deficiency disrupts the differentiation process of nail development. *The Journal of investigative dermatology* 133(8):1990-1997.
- Cumano A, Furlonger C & Paige CJ (1993) Differentiation and characterization of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10-to 12-somite stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(14):6429-6433.
- Daruna JH (2012) *Introduction to psychoneuroimmunology*. Academic Press,

- Darwiche W, Gubler B, Marolleau J-P & Ghamlouch H (2018) Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Frontiers in Immunology* 9(683).
- Dauphinee M, Tovar Z & Talal N (1988) B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism* 31(5):642-647.
- De Marco P, Merello E, Rossi A, Piatelli G, Cama A, Kibar Z & Capra V (2012) FZD6 is a novel gene for human neural tube defects. *Human Mutation* 33(2):384-390.
- Descatoire M, Weill J-C, Reynaud C-A & Weller S (2011) A human equivalent of mouse B-1 cells? *Journal of Experimental Medicine* 208(13):2563-2564.
- Descatoire M, Weller S, Irtan S, Sarnacki S, Feuillard J, Storck S, Guiochon-Mantel A, Bouligand J, Morali A, Cohen J, Jacquemin E, Iacone M, Bole-Feysot C, Cagnard N, Weill J-C & Reynaud C-A (2014) Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *The Journal of experimental medicine* 211(5):987-1000.
- Dhagat U, Hercus TR, Broughton SE, Nero TL, Cheung Tung Shing KS, Barry EF, Thomson CA, Bryson S, Pai EF, McClure BJ, Schrader JW, Lopez AF & Parker MW (2018) The mechanism of GM-CSF inhibition by human GM-CSF auto-antibodies suggests novel therapeutic opportunities. *mAbs* 10(7):1018-1029.
- Domingues RG, Lago-Baldaia I, Pereira-Castro I, Fachini JM, Oliveira L, Drpic D, Lopes N, Henriques T, Neilson JR, Carmo AM & Moreira A (2016) CD5 expression is regulated during human T-cell activation by alternative polyadenylation, PTBP1, and miR-204. *European journal of immunology* 46(6):1490-1503.
- Dong B, Vold S, Olvera-Jaramillo C & Chang H (2018) Functional redundancy of frizzled 3 and frizzled 6 in planar cell polarity control of mouse hair follicles. *Development* 145(19):dev168468.
- Døsen G, Tenstad E, Nygren MK, Stubberud H, Funderud S & Rian E (2006) Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunol* 7:13-13.
- Duan B & Morel L (2006) Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 5(6):403-408.
- Dunn-Walters DK, Isaacson PG & Spencer J (1995) Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *Journal of Experimental Medicine* 182(2):559-566.
- Ellis TM, Moser MT, Le PT, Flanigan RC & Kwon ED (2001) Alterations in peripheral B cells and B cell progenitors following androgen ablation in mice. *International Immunology* 13(4):553-558.
- Famili F, Naber BAE, Vloemans S, de Haas EFE, Tiemessen MM & Staal FJT (2015) Discrete roles of canonical and non-canonical Wnt signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis. *Cell Death Dis* 6(11):e1981-e1981.
- Fanto M, Weber U, Strutt DI & Mlodzik M (2000) Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the Drosophila eye. *Current Biology* 10(16):979-S971.
- Fitzpatrick SF (2019) Immunometabolism and Sepsis: A Role for HIF? *Front Mol Biosci* 6:85-85.
- Foon KA, Rai KR & Gale RP (1990) Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Annals of Internal Medicine* 113(7):525-539.

- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin J-P, Davenport AP, Spedding M & Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacological Reviews* 57(2):279-288.
- Frame JM, Fegan KH, Conway SJ, McGrath KE & Palis J (2016) Definitive hematopoiesis in the yolk sac emerges from Wnt-responsive hemogenic endothelium independently of circulation and arterial identity. *Stem cells* 34(2):431-444.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG & Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6):1256-1272.
- Fröjmark A-S, Schuster J, Sobol M, Entesarian M, Kilander Michaela BC, Gabrikova D, Nawaz S, Baig Shahid M, Schulte G, Klar J & Dahl N (2011) Mutations in Frizzled 6 Cause Isolated Autosomal-Recessive Nail Dysplasia. *The American Journal of Human Genetics* 88(6):852-860.
- Fu Y, Chang H, Peng X, Bai Q, Yi L, Zhou Y, Zhu J & Mi M (2014) Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *PloS one* 9(7).
- Ghia P, Ferreri AJ & Caligaris-Cappio F (2007) Chronic lymphocytic leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 64(3):234-246.
- Ghimire SR & Deans MR (2019) Frizzled3 and Frizzled6 Cooperate with Vangl2 to Direct Cochlear Innervation by type II Spiral Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience* 39(41):8013-8023.
- Ghosn EEB, Waters J, Phillips M, Yamamoto R, Long BR, Yang Y, Gerstein R, Stoddart CA, Nakauchi H & Herzenberg LA (2016) Fetal hematopoietic stem cell transplantation fails to fully regenerate the B-lymphocyte compartment. *Stem cell reports* 6(1):137-149.
- Ghosn EEB, Yamamoto R, Hamanaka S, Yang Y, Herzenberg LA, Nakauchi H & Herzenberg LA (2012) Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(14):5394-5398.
- Ghosn EEB & Yang Y (2015) Hematopoietic stem cell-independent B-1a lineage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1362(1):23-38.
- Giles RH, van Es JH & Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1653(1):1-24.
- Girardi F & Le Grand F (2018) Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Progress in molecular biology and translational science* 153:157-179.
- Godin I, Dieterlen-Lièvre F & Cumano A (1995) B-lymphoid potential in pre-liver mouse embryo. *Seminars in immunology*. Elsevier, p 131-141.
- Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lièvre F & Marcos MA (1993) Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364(6432):67.
- Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G & Gazit A (2004) The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt- $\beta$ -catenin signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry* 279(15):14879-14888.
- Gordon-Keylock S, Sobiesiak M, Rybtsov S, Moore K & Medvinsky A (2013) Mouse extraembryonic arterial vessels harbor precursors capable of maturing into definitive HSCs. *Blood* 122(14):2338-2345.

- Griffin DO, Holodick NE & Rothstein TL (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD70<sup>-</sup>. *Journal of Experimental Medicine* 208(1):67-80.
- Griffin DO & Rothstein TL (2011) A small CD11b<sup>+</sup> human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *Journal of Experimental Medicine* 208(13):2591-2598.
- Grönwall C, Vas J & Silverman G (2012) Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Frontiers in Immunology* 3(66).
- Gubb D & Garcia-Bellido A (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 68:37-57.
- Guimarães-Cunha CF, Alvares-Saraiva AM, de Souza Apostolico J & Popi AF (2016) Radiation-resistant B-1 cells: A possible initiating cells of neoplastic transformation. *Immunobiology* 221(7):845-852.
- Guo N, Hawkins C & Nathans J (2004) Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25):9277-9281.
- Haas KM, Poe JC, Steeber DA & Tedder TF (2005) B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23(1):7-18.
- Hadland BK, Varnum-Finney B, Mandal PK, Rossi DJ, Poulos MG, Butler JM, Rafii S, Yoder MC, Yoshimoto M & Bernstein ID (2017) A common origin for B-1a and B-2 lymphocytes in clonal pre-hematopoietic stem cells. *Stem cell reports* 8(6):1563-1572.
- Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, Blumenberg M, Bowcock AM, Krueger JG & Carucci JA (2006) Genomic Analysis Defines a Cancer-Specific Gene Expression Signature for Human Squamous Cell Carcinoma and Distinguishes Malignant Hyperproliferation from Benign Hyperplasia. *Journal of Investigative Dermatology* 126(4):869-881.
- Hall A & Yates C (2010) *Immunology*. Oxford University Press, Oxford. 13-273 p
- Hallek M (2019) Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology* 94(11):1266-1287.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG & Stevenson FK (1999) Unmutated Ig V H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94(6):1848-1854.
- Han K, Lang T, Zhang Z, Zhang Y, Sun Y, Shen Z, Beuerman RW, Zhou L & Min D (2018) Luteolin attenuates Wnt signaling via upregulation of FZD6 to suppress prostate cancer stemness revealed by comparative proteomics. *Scientific Reports* 8(1):8537.
- Happé H, de Heer E & Peters DJM (2011) Polycystic kidney disease: The complexity of planar cell polarity and signaling during tissue regeneration and cyst formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812(10):1249-1255.
- Hardy R & Hayakawa K (1991) A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(24):11550-11554.
- Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD & Hayakawa K (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 173(5):1213-1225.

- Hardy RR & Hayakawa K (2001) B cell development pathways. *Annual review of immunology* 19(1):595-621.
- Hardy RR & Hayakawa K (2015) Perspectives on fetal derived CD5+ B1 B cells. *European Journal of Immunology* 45(11):2978-2984.
- Hassan J, Yanni G, Hegarty V, Feighery C, Bresnihan B & Whelan A (1996) Increased numbers of CD5+ B cells and T cell receptor (TCR) gamma delta+ T cells are associated with younger age of onset in rheumatoid arthritis (RA). *Clinical and experimental immunology* 103(3):353-356.
- Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR & Herzenberg LA (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *Journal of Experimental Medicine* 157(1):202-218.
- Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosil J & Perreault C (2011) Wnt4 Enhances Murine Hematopoietic Progenitor Cell Expansion Through a Planar Cell Polarity-Like Pathway. *PLOS ONE* 6(4):e19279.
- Herzenberg LA (2000) B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunological reviews* 175(1):9-22.
- Hilgendorf I, Theurl I, Gerhardt LMS, Robbins CS, Weber GF, Gonen A, Iwamoto Y, Degousee N, Holderried TAW, Winter C, Zirlik A, Lin HY, Sukhova GK, Butany J, Rubin BB, Witztum JL, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R & Swirski FK (2014) Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation* 129(16):1677-1687.
- Hoffman W, Lakkis FG & Chalasani G (2016) B cells, antibodies, and more. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 11(1):137-154.
- Honda S-i, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K & Shibuya A (2016) Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signalling. *Nature Communications* 7(1):11498.
- Huang H-C & Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome biology* 5(7):234-234.
- Huang T, Alvarez AA, Pangeni RP, M. Horbinski C, Lu S, Kim S-H, James CD, J. Raizer J, A. Kessler J, Brenann CW, Sulman EP, Finocchiaro G, Tan M, Nishikawa R, Lu X, Nakano I, Hu B & Cheng S-Y (2016) A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nature Communications* 7(1):12885.
- Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C & Birchmeier W (2000) Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148(3):567-578.
- Imler J-L & Hoffmann JA (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11(7):304-311.
- Inestrosa NC, Montecinos-Oliva C & Fuenzalida M (2012) Wnt Signaling: Role in Alzheimer Disease and Schizophrenia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 7(4):788-807.
- Inestrosa NC & Varela-Nallar L (2013) Wnt signaling roles on the structure and function of the central synapses: involvement in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*, IntechOpen.



- Inestrosa NC & Varela-Nallar L (2014) Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Cell Biology* 6(1):64-74.
- Ishikawa S (2005) Possible roles of B1 cells and environmental estrogens (endocrine disruptors) in the development of autoimmune diseases. *Allergology International* 54(4):499-505.
- Janeway Jr CA, Travers P, Walport M & Shlomchik MJ (2001) Principles of innate and adaptive immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition, Garland Science.
- Janovská P & Bryja V (2017) Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *British journal of pharmacology* 174(24):4701-4715.
- Kageyama Y & Katayama N (2019) Ontogeny of human B1 cells. *International journal of hematology* :1-6.
- Kantor AB & Herzenberg LA (1993) Origin of murine B cell lineages. *Annual review of immunology* 11(1):501-538.
- Kantor AB, Stall AM, Adams S & Herzenberg LA (1992) Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(8):3320-3324.
- Kaur BP & Secord E (2019) Innate Immunity. *Pediatric clinics of North America* 66(5):905-911.
- Kaveri SV, Silverman GJ & Bayry J (2012) Natural IgM in Immune Equilibrium and Harnessing Their Therapeutic Potential. *The Journal of Immunology* 188(3):939-945.
- Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11(5):373-384.
- Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, Wynn JL, Lee PY, Kumagai Y, Efron PA, Akira S, Wasserfall C, Atkinson MA & Moldawer LL (2011) B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 208(8):1673-1682.
- Kikushige Y (2019) Pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia and human B1 cell development. *International Journal of Hematology* 10.1007/s12185-019-02788-7.
- Klinker MW & Lundy SK (2012) Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Molecular medicine* 18(1):123.
- Kobayashi M, Shelley WC, Seo W, Vemula S, Lin Y, Liu Y, Kapur R, Taniuchi I & Yoshimoto M (2014) Functional B-1 progenitor cells are present in the hematopoietic stem cell-deficient embryo and depend on Cbfb for their development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(33):12151-12156.
- Kohn AD & Moon RT (2005) Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38(3):439-446.
- Koike J, Takagi A, Miwa T, Hirai M, Terada M & Katoh M (1999) Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family. *Biochemical and biophysical research communications* 262(1):39-43.
- Krützfeldt J, Rösch N, Hausser J, Manoharan M, Zavolan M & Stoffel M (2012) MicroRNA-194 is a target of transcription factor 1 (Tcf1, HNF1 $\alpha$ ) in adult liver and controls expression of frizzled-6. *Hepatology* 55(1):98-107.
- Kühl M (2004) The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9:967-974.

- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR & Moon RT (2000) The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in Genetics* 16(7):279-283.
- Lai S-L, Chien AJ & Moon RT (2009) Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Research* 19(5):532-545.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M & Hoffmann JA (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86(6):973-983.
- Li Y-S, Wasserman R, Hayakawa K & Hardy RR (1996) Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5(6):527-535.
- Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R & Jones SN (2003) Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer cell* 4(5):349-360.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X & He X (2002) Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108(6):837-847.
- Luis TC, Weerkamp F, Naber BAE, Baert MRM, de Haas EFE, Nikolic T, Heuvelmans S, De Krijger RR, van Dongen JJM & Staal FJT (2009) Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* 113(3):546-554.
- MacDonald BT, Tamai K & He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17(1):9-26.
- Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H & Zinkernagel RM (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288(5474):2222-2226.
- Macpherson AJ & Slack E (2007) The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Current Opinion in Gastroenterology* 23(6):673-678.
- Malhotra S, Baba Y, Garrett KP, Staal FJT, Gerstein R & Kincade PW (2008) Contrasting Responses of Lymphoid Progenitors to Canonical and Noncanonical Wnt Signals. *The Journal of Immunology* 181(6):3955-3964.
- Mamidi S, Höne S & Kirschfink M (2017) The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology* 222(1):45-54.
- Mangge H, Prüller F, Schnedl W, Renner W & Almer G (2020) Beyond Macrophages and T Cells: B Cells and Immunoglobulins Determine the Fate of the Atherosclerotic Plaque. *Int J Mol Sci* 21(11):4082.
- Marshak-Rothstein A (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology* 6(11):823-835.
- Martin F & Kearney JF (2000) B-cell subsets and the mature -preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunological Reviews* 175(1):70-79.
- Martin F & Kearney JF (2001) B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 13(2):195-201.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-397.

- Melchers F, Ten Boekel E, Seidl T, Kong XC, Yamagami T, Onishi K, Shimizu T, Rolink AG & Andersson J (2000) Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunological reviews* 175(1):33-46.
- Merino MC & Gruppi A (2006) [Origin and development of B1 lymphocytes. A cell population involved in defence and autoimmunity]. *Medicina (B Aires)* 66(2):165-172.
- Mezzacappa C, Komiya Y & Habas R (2012) Activation and function of small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 during gastrulation. *Planar Cell Polarity*, Springer. p 119-131.
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA & Bogani D (2006) Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *Journal of Neuroscience* 26(19):5265-5275.
- Montecino-Rodriguez E & Dorshkind K (2012) B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity* 36(1):13-21.
- Montecino-Rodriguez E, Leathers H & Dorshkind K (2006) Identification of a B-1 B cell–specified progenitor. *Nature Immunology* 7(3):293-301.
- Moon B-g, Takaki S, Miyake K & Takatsu K (2004a) The Role of IL-5 for Mature B-1 Cells in Homeostatic Proliferation, Cell Survival, and Ig Production. *The Journal of Immunology* 172(10):6020-6029.
- Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD & Kaykas A (2004b) WNT and  $\beta$ -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics* 5(9):691-701.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B & Kinzler KW (1997) Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 275(5307):1787-1790.
- Morris G, Puri BK, Olive L, Carvalho AF, Berk M & Maes M (2019) Emerging role of innate B1 cells in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune diseases: Association with inflammation, oxidative and nitrosative stress and autoimmune responses. *Pharmacological research* :104408.
- Murakami M, Yoshioka H, Shirai T, Tsubata T & Honjo T (1995) Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *International Immunology* 7(5):877-882.
- Naz G, Pasternack SM, Perrin C, Mattheisen M, Refke M, Khan S, Gul A, Simons M, Ahmad W & Betz RC (2012) FZD6 encoding the Wnt receptor frizzled 6 is mutated in autosomal-recessive nail dysplasia. *British Journal of Dermatology* 166(5):1088-1094.
- Nusse R & Clevers H (2017) Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169(6):985-999.
- Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YKT & Varmus H (1984) Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 307(5947):131-136.
- O'garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G & Howard M (1992) Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European Journal of Immunology* 22(3):711-717.
- Oliva CA, Vargas JY & Inestrosa NC (2013) Wnt signaling: Role in LTP, neural networks and memory. *Ageing Research Reviews* 12(3):786-800.

- Osmond DG, Rolink A & Melchers F (1998) Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunology today* 19(2):65-68.
- Osugui L, de Roo JJ, de Oliveira VC, Sodré ACP, Staal FJT & Popi AF (2018) B-1 cells and B-1 cell precursors prompt different responses to Wnt signaling. *PLOS ONE* 13(6):e0199332.
- Otero DC, Poli V, David M & Rickert RC (2006) Cutting Edge: Inherent and Acquired Resistance to Radiation-Induced Apoptosis in B Cells: A Pivotal Role for STAT3. *The Journal of Immunology* 177(10):6593-6597.
- Parham P (2014) *The immune system*. Garland Science. 532 p
- Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJM, Orfao A & van Zelm MC (2011) The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *The Journal of Experimental Medicine* 208(13):2565-2566.
- Pers J-O, Le Pottier L, Devauchelle V, Saraux A & Youinou P (2008) Les lymphocytes B dans le syndrome de Gougerot-Sjögren. *La Revue de médecine interne* 29(12):1000-1006.
- Piao S, Lee S-H, Kim H, Yum S, Stamos JL, Xu Y, Lee S-J, Lee J, Oh S, Han J-K, Park B-J, Weis WI & Ha N-C (2008) Direct Inhibition of GSK3 $\beta$  by the Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *PLOS ONE* 3(12):e4046.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ & Skarnes WC (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407(6803):535-538.
- Plein A, Fantin A, Denti L, Pollard JW & Ruhrberg C (2018) Erythro-myeloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels. *Nature* 562(7726):223-228.
- Plitzko B & Loesgen S (2018) Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR) in Culture Cells for Assessment of the Energy Metabolism. *Bio-protocol* 8(10):e2850.
- Quách TD, Hopkins TJ, Holodick NE, Vuyyuru R, Manser T, Bayer R-L & Rothstein TL (2016) Human B-1 and B-2 B Cells Develop from Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>lo</sup> Stem Cells. *The Journal of Immunology* 10.4049/jimmunol.1600630:1600630.
- Randall TD (2010) Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT): structure and function. *Advances in immunology*, Elsevier, Vol 107. p 187-241.
- Ranheim EA, Kwan HCK, Reya T, Wang Y-K, Weissman IL & Francke U (2005) Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* 105(6):2487-2494.
- Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, Tiglaio E, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Theurl I, Gorbatov R, Waring MT, Chicoine AT, Mouded M, Pittet MJ, Nahrendorf M, Weissleder R & Swirski FK (2012) Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 335(6068):597-601.
- Revillard J-P (2001) *Immunologie*. De Boeck, Bruxelles. 595 p
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R & Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423(6938):409-414.
- Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R & Grosschedl R (2000) Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. *Immunity* 13(1):15-24.

- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D & Nusse R (1987) The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50(4):649-657.
- Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG & Seymour JF (2015) Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 374(4):311-322.
- Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD & Kaku H (2013) Human B-1 cells take the stage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1285(1):97-114.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E & Polakis P (1997) Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275(5307):1790-1792.
- Sarhan M, Land WG, Tonnus W, Hugo CP & Linkermann A (2018) Origin and consequences of necroinflammation. *Physiological reviews* 98(2):727-780.
- Sato M & Tamura M (2016) Noncanonical Wnt signaling in stromal cells regulates B-lymphogenesis through interleukin-7 expression. *Biochemistry and Biophysics Reports* 6:179-184.
- Schlessinger K, Hall A & Tolwinski N (2009) Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes & development* 23(3):265-277.
- Schulte G (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The Class Frizzled Receptors. *Pharmacological Reviews* 62(4):632-667.
- Schulte G & Bryja V (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 28(10):518-525.
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC & Moon RT (1999) Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Current Biology* 9(13):695-S691.
- Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA & Lederer JA (2003) Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock (Augusta, Ga.)* 20(2):123-129.
- Shiomi A, Usui T & Mimori T (2016) GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflammation and Regeneration* 36(1):8.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A (2020) Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70(1):7-30.
- Simons M & Mlodzik M (2008) Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annual Review of Genetics* 42(1):517-540.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L & Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801-810.
- Singh H & Grosschedl R (2005) *Molecular analysis of B lymphocyte development and activation*. Springer Science & Business Media,

- Sinha S & Yang W (2008) Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cellular Signalling* 20(11):1927-1934.
- Slusarski DC, Corces VG & Moon RT (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390(6658):410.
- Slusarski DC & Pelegri F (2007) Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Developmental Biology* 307(1):1-13.
- Snow EC (2012) *Handbook of B and T Lymphocytes*. Academic Press. 505 p
- Society AC (2020) Cancer Facts & Figures 2020. CA: *A Cancer Journal for Clinicians* <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- Soldevila G, Raman C & Lozano F (2011) The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. *Current opinion in immunology* 23(3):310-318.
- Staal FJ & M. Sen J (2008) The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *European journal of immunology* 38(7):1788-1794.
- Staal FJT & Clevers HC (2005) WNT signalling and haematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nature Reviews Immunology* 5(1):21-30.
- Staal FJT, Luis TC & Tiemessen MM (2008) WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology* 8(8):581-593.
- Strutt D, Madder D, Chaudhary V & Artymiuk PJ (2012) Structure–Function Dissection of the Frizzled Receptor in *Drosophila melanogaster* Suggests Different Mechanisms of Action in Planar Polarity and Canonical Wnt Signaling. *Genetics* 192(4):1295-1313.
- Su N, Wang P & Li Y (2016) Role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in inducing autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells. *Oncol Lett* 12(6):4623-4629.
- Subramaniam KS, Datta K, Quintero E, Manix C, Marks MS & Pirofski LA (2010) The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184(10):5755-5767.
- Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, Dutta J, Yasui H, Rooney MD, Carrasco DE, Zheng M, He H, Tai Y-T, Mitsiades C, Anderson KC & Carrasco DR (2007) Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(18):7516-7521.
- Takeda K, Kaisho T & Akira S (2003) Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology* 21(1):335-376.
- Tokuhara M, Hirai M, Atomi Y, Terada M & Katoh M (1998) Molecular Cloning of Human Frizzled-6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243(2):622-627.
- Tolwinski NS & Wieschaus E (2004) Rethinking WNT signaling. *Trends in Genetics* 20(4):177-181.
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C & Grosschedl R (1991) LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes & development* 5(5):880-894.
- Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg LA & Herzenberg LA (2006) Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(16):6293-6298.

- Turvey SE & Broide DH (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S24-S32.
- Umbhauer M, Djiane A, Goisset C, Penzo-Méndez A, Riou J-F, Boucaut J-C & Shi D-L (2000) The C-terminal cytoplasmic Lys-Thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *The EMBO Journal* 19(18):4944-4954.
- van Amerongen R & Nusse R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19):3205-3214.
- van de Wetering M, de Lau W & Clevers H (2002) WNT Signaling and Lymphocyte Development. *Cell* 109(2, Supplement 1):S13-S19.
- Van Wyngene L, Vandewalle J & Libert C (2018) Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO Mol Med* 10(8):e8712.
- VanderVorst K, Dreyer CA, Konopelski SE, Lee H, Ho H-YH & Carraway KL (2019) Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. *Cancer Research* 79(8):1719-1729.
- Varela-Nallar L, Ramirez VT, Gonzalez-Billault C & Inestrosa NC (2012) Frizzled receptors in neurons: from growth cones to the synapse. *Cytoskeleton* 69(7):528-534.
- Veeman MT, Axelrod JD & Moon RT (2003) A Second Canon: Functions and Mechanisms of  $\beta$ -Catenin-Independent Wnt Signaling. *Dev Cell* 5(3):367-377.
- Vincan E & Barker N (2008) The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clinical & Experimental Metastasis* 25(6):657-663.
- Vinson CR, Conover S & Adler PN (1989) A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338(6212):263-264.
- Wagner W, Ansorge A, Wirkner U, Eckstein V, Schwager C, Blake J, Miesala K, Selig J, Saffrich R, Ansorge W & Ho AD (2004) Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* 104(3):675-686.
- Wang H-y, Liu T & Malbon CC (2006a) Structure-function analysis of Frizzleds. *Cellular Signalling* 18(7):934-941.
- Wang Y, Chang H & Nathans J (2010) When whorls collide: the development of hair patterns in frizzled 6 mutant mice. *Development (Cambridge, England)* 137(23):4091-4099.
- Wang Y, Chang H, Rattner A & Nathans J (2016) Frizzled Receptors in Development and Disease. *Current topics in developmental biology* 117:113-139.
- Wang Y, Guo N & Nathans J (2006b) The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *Journal of Neuroscience* 26(8):2147-2156.
- Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA & Nathans J (1996) A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* 271(8):4468-4476.
- Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, Brenner T, Uhle F, Iwamoto Y & Robbins CS (2015) Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347(6227):1260-1265.
- Weber GF, Chousterman BG, Hilgendorf I, Robbins CS, Theurl I, Gerhardt LMS, Iwamoto Y, Quach TD, Ali M, Chen JW, Rothstein TL, Nahrendorf M, Weissleder R & Swirski FK

- (2014) Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *The Journal of Experimental Medicine* 211(6):1243-1256.
- Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, Larsen R, Rebelo S, Schäuble S, Del Barrio L, Mithieux G, Rajas F, Lindig S, Bauer M & Soares MP (2017) Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell* 169(7):1263-1275.e1214.
- Wentowski C, Mewada N & Nielsen ND (2019) Sepsis in 2018: a review. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 20(1):6-13.
- Westfall TA, Brimeyer R, Twedt J, Gladon J, Olberding A, Furutani-Seiki M & Slusarski DC (2003) Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin activity. *J Cell Biol* 162(5):889-898.
- Wortis HH & Berland R (2001) Cutting Edge Commentary: Origins of B-1 Cells. *The Journal of Immunology* 166(4):2163-2166.
- Wu Q-L, Zierold C & Ranheim EA (2009) Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113(13):3031-3039.
- Xu D, Zhao M, Song Y, Song J, Huang Y & Wang J (2015) Novel insights in preventing Gram-negative bacterial infection in cirrhotic patients: review on the effects of GM-CSF in maintaining homeostasis of the immune system. *Hepatology International* 9(1):28-34.
- Yan J, Liu T, Zhou X, Dang Y, Yin C & Zhang G (2016) FZD6, targeted by miR-21, represses gastric cancer cell proliferation and migration via activating non-canonical wnt pathway. *Am J Transl Res* 8(5):2354-2364.
- Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, Zhang F, Mohammed MK, Haydon RC, Luu HH, Bi Y & He T-C (2016) The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Laboratory Investigation* 96(2):116-136.
- Yoshimoto M, Montecino-Rodriguez E, Ferkowicz MJ, Porayette P, Shelley WC, Conway SJ, Dorshkind K & Yoder MC (2011) Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(4):1468-1473.
- Yu Q, Quinn WJ, 3rd, Salay T, Crowley JE, Cancro MP & Sen JM (2008) Role of beta-catenin in B cell development and function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(6):3777-3783.
- Yzaguirre AD & Speck NA (2016) Insights into blood cell formation from hemogenic endothelium in lesser-known anatomic sites. *Developmental Dynamics* 245(10):1011-1028.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J & He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438(7069):873-877.
- Zeng Z, Surewaard BGJ, Wong CHY, Guettler C, Petri B, Burkhard R, Wyss M, Le Moual H, Devinney R, Thompson GC, Blackwood J, Joffe AR, McCoy KD, Jenne CN & Kubers P (2018) Sex-hormone-driven innate antibodies protect females and infants against EPEC infection. *Nature Immunology* 19(10):1100-1111.



- Zhang J, Wang JL, Zhang CY, Ma YF, Zhao R & Wang YY (2019) The prognostic role of FZD6 in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clinical and Translational Oncology* 10.1007/s12094-019-02243-3.
- Zhong X, Lau S, Bai C, Degauque N, Holodick NE, Steven SJ, Tumang J, Gao W & Rothstein TL (2009) A novel subpopulation of B-1 cells is enriched with autoreactivity in normal and lupus-prone mice. *Arthritis and rheumatism* 60(12):3734-3743.
- Zou L, Wang X, Jiang L, Wang S, Xiong X, Yang H, Gao W, Gong M, Hu C-AA & Yin Y (2017) Molecular cloning, characterization and expression analysis of Frizzled 6 in the small intestine of pigs (*Sus scrofa*). *PLOS ONE* 12(6):e0179421.
- Zouali M & Richard Y (2011) Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Frontiers in immunology* 2:63-63.