

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Bio-Santé (n° 524)

Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 6101

"Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations" (PMRIL)

Equipe "Mécanismes Moléculaires de la Lymphomagenèse"

Thèse n° 64-2009

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Spécialité : Immunologie, onco-hématologie, infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie DURAND-PANTEIX

Le 23 novembre 2009

C-Myc et lymphomagenèse dans les cellules B infectées par le virus d'Epstein-Barr

Thèse dirigée par le Pr Jean FEUILLARD

Président :

M. Michel COGNE, Professeur des Universités, Limoges.

Rapporteurs :

Mme. Evelyne MANET, Directeur de Recherche, INSERM, Lyon.

M. Pierre BUSSON, Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif.

Examineurs :

Mme. Danielle TROUTAUD, Professeur des Universités, Limoges.

Mme. Fabienne MEGETTO-PRADELLE, Chargée de Recherche, INSERM, Toulouse.

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, Limoges.

C-Myc et lymphomagenèse dans les cellules B infectées par le virus d'Epstein-Barr

Ce travail visait à étudier l'implication de l'oncogène *c-myc* dans la lymphomagenèse, et ce dans un contexte d'infection des cellules B par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Il s'est articulé autour de trois axes. Dans un premier temps, nous avons montré que les facteurs c-Myc et NF-κB sont les deux principaux systèmes transcriptionnels activés dans les cellules B EBV+ en latence III, responsables de leur phénotype, de leur profil de prolifération et de leurs propriétés biologiques. Nous avons ensuite initié un travail concernant l'étude des rôles de c-Myc et de l'EBV dans la régulation de l'expression d'une molécule de co-signalisation de la réponse immune : la protéine B7-H1. Nous montrons que l'EBV augmente l'expression de cette protéine, alors que c-Myc la réprime, aux niveaux transcriptionnel et de son export à la membrane cellulaire. Enfin, nous avons élaboré de nouveaux vecteurs plaçant l'oncogène *c-myc* (ou le gène rapporteur *luciférase*) sous le contrôle de la région régulatrice située en 3' du locus des gènes des immunoglobulines (LCR 3'IgH) : les vecteurs pHEBo-pV_H-*Luc/Myc*-LCR 3'IgH. La transfection du vecteur contenant c-Myc dans la lignée EREB2-5, dépendante de l'œstrogène pour sa prolifération, a permis sa transformation en une lignée proliférante indépendante de cette hormone. En cela, il pourrait s'agir d'un nouvel outil moléculaire d'intérêt permettant d'étudier à la fois l'activité transcriptionnelle de LCR 3'IgH et le pouvoir transformant de c-Myc.

Mots-clés : C-Myc, lymphomagenèse, cellule B, virus d'Epstein-Barr (EBV), NF-κB, B7-H1, LCR 3'IgH.

C-Myc and lymphomagenesis in Epstein-Barr virus-infected B cells

This work aimed to study the involvement of the *c-myc* oncogene in lymphomagenesis, in a context of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells. It was structured around three axes. We first showed that the c-Myc and NF-κB factors are the two master transcriptional systems activated in latency III program of EBV + B cells, responsible for their phenotype, their proliferation profile and their biological properties. Then, we started a work on the roles of c-Myc and EBV in the regulation of the expression of a co-signaling molecule of the immune response: B7-H1. We have shown that EBV increases B7-H1 expression and c-Myc decreases it at transcriptional and membrane cellular export levels. Finally, we have developed new vectors placing the *c-myc* oncogene (or luciferase reporter gene) under the control of the 3' regulatory region lying downstream of the immunoglobulin locus (3'IgH LCR). These vectors are named pHEBo-pV_H-*Luc/Myc*-3'IgH LCR. The transfection of the vector containing c-Myc in EREB2-5 cell line, estrogen-dependant for its proliferation, led its transformation into an estrogen-independent proliferative cell line. Thus, it could be a new molecular tool of interest to study both the transcriptional activity of 3'IgH LCR and the transforming power of c-Myc.

Keywords : C-Myc, lymphomagenesis, B cell, Epstein-Barr virus (EBV), NF-κB, B7-H1, 3'IgH LCR.

A mon mari, Nolio'

A mes parents, Chantal et Daniel

A mon frère, Fidj'

Remerciements

Je commencerai par remercier le Dr Michel Cogné de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à remercier ensuite le Dr Jean Feuillard pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail, pour sa disponibilité et pour ses compétences scientifiques. Comme lors de mon DGA, oserai-je répéter : "c'est compliqué la vie !".

J'exprime ma profonde gratitude envers Mr Pierre Busson et Mme Evelynne Manet pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse. Je remercie également Mmes Fabienne Mégetto et Danielle Troutaud d'avoir examiné ce travail.

Je remercie l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour leur soutien financier accordé lors de ma dernière année de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du 2^{ème} étage, passés ou présents : Cathy, Chantal, Christophe, David, Nadine et Tan. Trois jeunes femmes m'ont particulièrement soutenue tout au long de ces années. Tout d'abord, merci à Sbtissam qui m'a enseignée l'art du donage et de la mini-prép en DGA, merci également à Abdel et bonne route à vous. Ensuite, je tiens particulièrement à adresser mes plus sincères remerciements à Nath' auprès de qui j'ai beaucoup appris. Si cette thèse est ce qu'elle est, c'est aussi grâce à toi. Merci particulièrement pour tes nombreuses relectures et ton aide une certaine après-midi d'octobre alors que j'étais en panique de discussion ! Je te souhaite une belle carrière : tu le mérites. Enfin, merci à Aurélie, tout d'abord collègue, puis amie. Merci pour ton soutien sans faille. On a formé un chouette binôme de gestion du labo ! Bon courage pour la fin de la thèse et tous mes vœux à ta petite famille qui va bientôt s'agrandir.

Je remercie ensuite tous mes collègues du 3^{ème} pour leur bonne humeur, leur sympathie et les nombreuses petites bouffes dans la grotte : Aurélien, Brice, Carine, Cathy, Pndrine, Shahrazed, Christelle O, Christelle V.F, Christian, Claire, Crap, Eric (merci particulièrement pour les nombreuses discussions et conseils sur la LCR et pour la relecture de cette partie du mémoire), Fabien, Guillaume, Laurent, Marie, Rada (bon courage pour la dernière ligne droite), Rémi, Seb, Sophie D, Sophie R, Virginie (bientôt les vacances), Véro, Yves, Zéliha et ma collègue de DGA Anne-Gaëlle (je te souhaite de belles choses pour la suite). Merci également aux membres de SFD : Gaël, Armelle, Pécile et Marie.

Je remercie également le personnel du laboratoire d'hémato du CHU : Joël (pour les nombreuses commandes), Estelle, Nathalie, Marie-Pierre et Marie-Clair (pour la période "footprint"), mais aussi Marjorie, Grégory, Patrick, Jean-Luc, Marie-Jo, Brigitte, Mélanie, Rachel, Annie...

Lors de ma thèse, j'ai également eu la chance de m'initier à l'enseignement. Merci à l'équipe physio de la FST : Danielle, Caro, Mireille et Fabrice pour tous vos conseils, votre dynamisme et votre sympathie. Ce fut un réel plaisir que d'apprendre cette fonction à vos côtés. Je témoigne ma reconnaissance et ma sympathie à Danielle et Mireille, auprès de qui, lors de mon stage de licence, j'ai découvert et pris goût à la recherche. Danielle, je vous remercie également d'avoir été ma tutrice

pédagogique pendant ces 3 ans de monitorat et de m'avoir fait partager vos compétences d'enseignante. Enfin, merci d'avoir été à mon écoute lors des moments plus difficiles que peut connaître un thésard. Le monitorat m'a également permis de faire de belles rencontres grâce à l'atelier-projet, une expérience très formatrice pour les quelques personnes investies dans cette mission et un bel aboutissement avec la publication de notre travail : bonne continuation à vous Cécile, Lolo, Virginie, Dédé, Aurélien...

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier mes amis pour les bons moments passés ensemble : Rid & Céline, Fred & Cécile, Adib & Julie, Aurélie & Guillaume, Antoine & Juliette, ma collègue de révision en maîtrise (j'en profite pour adresser un clin d'œil aux membres de l'ACR2B, devenu ACN2B). Un grand merci à deux proches qui ont toujours été là, lors des grands moments (comme le projet X) et plus encore lors des moments les plus difficiles. Je veux bien entendu parler de mes Perreuxois préférés, alias Nono & Delph', je suis riche de vous connaître. Je remercie également ma famille et ma belle-famille, plus spécialement mon p'tit beauif' Thony, et j'ai une pensée pour les personnes qui sont parties prématurément.

J'en viens à présent à remercier du fond du cœur mon frangin. Pourtant, tu m'avais prévenue : "ne fais pas de thèse ma Schtouffy" ! Ce fut difficile, mais je m'en serai sortie ! Merci mon fidj' pour tout. Merci aux nouvelles technologies qui, malgré l'éloignement physique nous ont permis d'être toujours aussi proches. Combien d'heures au téléphone, combien de mails, et combien de jeux de mots (ah, le label) ?! Je "Muse" d'impatience à l'idée de lire le fameux acrostiche !

Je remercie également de tout mon cœur mes parents. Vous m'avez permis d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui. Vous avez été d'un soutien sans faille, toujours soucieux d'aider vos enfants, jusqu'à jouer les correcteurs d'orthographe à quelques jours d'imprimer ce mémoire ! Je suis fière de vous dédier cette thèse. Merci, merci, merci, merci,...

Je finirai par remercier celui qui partage ma vie depuis 10 ans maintenant et qui est devenu mon petit mari. Mon N'Oliv', tu m'accompagnes depuis le début de mes années fac, tu as toujours été là, dans les bons moments mais également lorsque le moral était au plus bas. Si j'en suis là, c'est également grâce à toi, tu as su me donner confiance en moi. Plus particulièrement concernant la thèse, merci pour tes relectures orthographiques et grammaticales et je te présente toutes mes félicitations d'avoir supporté tous les soirs de ces 5 dernières années le débrief des manips : tu dois être le physico-chimiste le plus calé en immunobio ! Bref, tout simplement, mais tellement sincèrement, Merci. A tes côtés, I'm feeling good ! Je t'aime.

Une main habile sans la tête qui la dirige est un instrument aveugle;
la tête sans la main qui réalise reste impuissante.

Introduction à l'étude de la médecine expérimentale,
Claude Bernard, éd. Baillière, 1865, p. 9

Abréviations

A

Ac : anticorps
AID : *activation induced cytidine deaminase*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ag : antigène
API : *activator protein 1*
Apaf : *apoptotic protease-activating factor*
APE1 : *apurinic/apyrimidic endonuclease 1*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARN pol I/II/III : ARN polymérase I/II/III
ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

B

B7-H1 : *B7-homolog 1*
Bad : *Bcl-X₁/Bcl-2 associated death promoter*
Bak : *Bcl-2-homologous antagonist-killer*
Bax : *Bcl-2-associated X protein*
Bcl-2 : *B cell lymphoma-2*
Bcl-X_L : *B cell leukemia XL*
BCR : *B cell receptor*
BER : *base excision repair*
Bid : *BH3 interacting domain death agonist*
Bim : *Bcl-2 interacting mediator of cell death*
BL : *Burkitt lymphoma*
BLNK : *B cell linker protein*
B-NHL : *B cell non-Hodgkin lymphoma*
BR : *basic region*
Bright : *B cell regulator of IgH transcription*
BSAP : *B cell specific activation protein*

C

CARD : *caspase recruitment domain*
Caspases : *cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*
CAT : *chloramphenicol acetyltransferase*
CBP : *c-AMP response element binding protein*
CD : *cluster of differentiation*

CDK : *cyclin dependant kinase*
CDKI : *CDK inhibitor*
CDR : *complementarity determining region*
CE : *carboxylesterase*
c-FLIP : *cellular-FLICE (FADD-like-1)- β -converting enzyme)-inhibitory protein*
C_H : région constante des chaînes lourdes (*heavy*) d'immunoglobulines
C_L : région constante des chaînes légères (*light*) d'immunoglobulines
CLP : progéniteurs lymphoïdes communs
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : *cytomégalo virus*
COP : *coatomer protein*
CPA : cellule présentatrice de l'antigène
CREB : *c-AMP-response element-binding protein*
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSR : *class switch recombination*
CTAR : *C-terminal activation region*
CTCF : *CCCTC-binding factor*
CTL : *cytotoxic T lymphocytes*
CTLA4 : *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*
CXCR : *chemokine (CXC motif) receptor*

D

D : segment de diversité
Da : dalton
DISC : *death-inducing signaling complex*
DMEM : *Dubelcco's modified eagle medium*
DNA-PK : *DNA-dependant protein kinase*
DNaseI : *désoxyribonucléase I*

E

E2F : *E2 promoter binding factor*
EBER : *EBV-encoded RNA*
EBF : *early-B cell factor*
EBNA : *EBV-encoded nuclear antigens*
EBV : *Epstein-Barr virus*
EGFP : *enhanced green fluorescent protein*
EPO : *érythropoïétine*
ER : *estrogen receptor*
Erk : *extracellular signal-regulated kinase*
EMSA : *electromobility shift assay*

F

FADD : *fas-associated death domain*
FDC : *follicular dendritic cell*
FGFR : *fibroblast growth factor receptor*
FOXP1 : *forkhead box P1*

G

GlcNAc : *N-acétylglucosamine*
GFP : *green fluorescent protein*
gp : glycoprotéine
GSK : *glycogen synthase kinase 3*

H

H2AX : *histone 2A family member X*
HA : *hemagglutinin*
HAT : *histone acetyltransferase*
HBV/HCV : *hepatitis B/C virus*
HDAC : *histone deacetylase*
HHV8 : *human herpes virus 8*
Hhs : *human hs*
HL : *Hodgkin lymphoma*
HLA : *human leukocyte antigen*
HLH : *helix-loop-helix*
hs : sites hypersensibles à la DNase
HSV-TK : *herpes simplex virus thymidine kinase*

I

ICAM : *intracellular adhesion molecule*
ICOS : *inducible co-stimulator*
IEG : *immediate-early gene*
IFN : *interférons*
Ig : immunoglobuline
IgH : chaîne lourde (*heavy*) des Ig
IgL : chaîne légère (*light*) des Ig
I κ B : *inhibitor of NF- κ B*
IKK : *I κ B kinase*
IL : *interleukine*
Inr : éléments initiateurs
IR : *internal repeat*
IRF : *intensité relative de fluorescence*
ITAF : *IRE5 (internal ribosome entry site)-trans-activating factor*
ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

J

J : segment de jonction
J_H : segment de jonction des chaînes lourdes (*heavy*)

J_L : segment de jonction des chaînes légères (*light*)

JNK : *c-Jun NH2-terminal kinase*

K

Kb : kilobases

kDa : kilodaltons

KO : *knockout*

L

LAMP-1 : *lysosome associated membrane protein 1*

LDH : *lactate dehydrogenase*

LCL : *lymphoblastoid cell line*

LCR : *locus control region*

LFA1/3 : *lymphocyte function-associated antigen-1/3*

LMP : *latent membrane protein*

LPS : lipopolysaccharide

LR1 : *lipopolysaccharide-responsive protein 1*

LZ : *leucine zipper*

M

MALT : *mucosa associated lymphoid tissue*

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MAR : *matrix associated region / matrix attachment region*

MARE : *maf recognition element*

MB : *Myc box*

MBV : *multivesicular bodies*

mi-ARN : *microARN*

MINE : *c-Myc insulator element*

Miz1 : *Msx-interacting-zinc finger*

MLH : *mutL homologue 1*

MLR : *mixed lymphocyte reaction*

N

Néo : *néomycine*

NFY : *nuclear factor Y*

NF-κB : *nuclear factor κB**

NGFR : *nerve growth factor receptor*

NHEJ : *non-homologous end-joining*

NIK : *NF-κB-inducing kinase*

NK : *natural killer*

NLS : *nuclear localization sequence*

NPC : *nasopharyngeal carcinoma*

O

ODC : *ornithine decarboxylase*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

OriP : *origine de réplication*

P

PAX : *paired box*

pB : *paire de bases*

PBS : *phosphate buffered saline*

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*

PCR : *polymerase chain reaction*

PDGF : *platelet-derived growth factor*

PDGFR : *PDGF receptor*

PD-1 : *program-death 1*

PD-L1 : *program-death ligand 1*

PE : *phycoérythrine*

PFA : *paraformaldéhyde*

PgK : *phosphoglycerate kinase*

PI3K : *phosphatidylinositol 3 kinase*

PLCγ2 : *phospholipase Cγ2*

pRb : *protéine du rétinoblastome*

P-TFEB : *positive transcription elongation factor b*

pV_H : *promoteur des régions variables des chaînes lourdes (heavy) d'immunoglobulines*

R

Rag : *recombination activating gene*

RANK : *receptor activator of NF-κB*

RE : *reticulum endoplasmique*

REAL : *revised european-american classification of lymphoid neoplasms*

RISC : *RNA-induced silencing complex*

RFLP : *restriction fragment length polymorphism*

RLU : *relative light units*

ROS : *reactive oxygen species*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

RS : *Reed-Sternberg*

rtTA : *reverse tetracycline transactivator*

RT-PCR : *reverse transcriptase-PCR*

S

SAP30 : *SIN3A-associated protein*

Ser : *sérine*

SHM : *somatic hypermutation*

SIDA : *syndrome de l'immunodéficience acquise*

SKIP : *SKI-interacting protein*

SLC : *surrogate light chain*

SMRT : *silencing mediator of retinoid and thyroid hormones*

SSC : *side scatter*

STAT : *signal transducer activator of transcription*

T

TAD : *transcriptional activation domain*

TAP : *T-cell-activating protein*

TBP : *TATA-binding protein*

TCR : *T cell receptor*

TdT : *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TER : *taux d'expression relatif*

TfR : *transferrin receptor*

TGF : *tumor growth factor*

Th : *lymphocytes T "helper"*

Thr : *thréonine*

TLR : *toll like receptor*

TNF : *tumor necrosis factor*

TNFR(SF) : *TNF receptor (superfamily)*

TRADD : *TNFR-associated death domain*

TRAF : *TNFR-associated factors*

TRAIL : *TNF-related apoptosis inducing ligand*

TRRAP : *transformation/transcription domain associated protein*

U

UNG : *uracyl-DNA glycosylase*

UPE : *upstream promoter element*

UTR : *untranslated region*

V

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

V_H : *région variable des chaînes lourdes (heavy) d'immunoglobulines*

VIH : *virus de l'immunodéficience humaine*

V_L : *région variable des chaînes légères (light) d'immunoglobulines*

VNTR : *variable number of tandem repeats*

W

WHO : *World Health Organization*

Y

YY1 : *YinYang 1*

Liste des figures

Figure 1 : Processus cellulaires contrôlés par c-Myc dans des conditions normales et lors de la tumorigénèse.	27
Figure 2 : Représentation schématique de la structure du gène c-myc et des deux protéines résultantes.....	29
Figure 3 : Localisation des séquences E-Box.	35
Figure 4 : Mécanismes d'induction de la transcription par c-Myc.	36
Figure 5 : Mécanismes de répression de la transcription par c-Myc.	38
Figure 6 : Le cycle cellulaire.....	41
Figure 7 : Le contrôle de la progression en G1 et du passage en G1/S par c-Myc.....	42
Figure 8 : Voies de signalisation impliquant c-Myc dans l'apoptose.	48
Figure 9 : Représentations d'une immunoglobuline.	60
Figure 10 : Les réarrangements VDJ.	62
Figure 11 : Le développement B dans la moelle osseuse.	63
Figure 12 : Le centre germinatif.	67
Figure 13 : Mécanisme de la recombinaison de classe.	71
Figure 14 : Programme transcriptionnel du développement B dans le centre germinatif et post-centre germinatif.	72
Figure 15 : Structure des loci IgH humain et murin.	74
Figure 16 : Représentation schématique des sites de fixation pour des facteurs de transcription chez la souris.	81
Figure 17 : Origine cellulaire des cellules B des différentes classes de lymphomes.....	86
Figure 18 : Représentations schématiques du génome de l'EBV.	93
Figure 19 : Rôle des protéines EBNA dans la transcription.....	96
Figure 20 : Structure et fonctions de LMP1.....	98
Figure 21 : Les effets immunomodulateurs de LMP1.	101
Figure 22 : Localisations des points de cassure dans la translocation t (8 ; 14).	104
Figure 23 : Description des modèles cellulaires EREB2-5, P493-6 et A1.	119
Figure 24 : Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux d'ARNm de B7-H1 de lignées EBV- vs EBV+.	158
Figure 25 : Analyse de l'expression membranaire de B7-H1 par microscopie confocale et cytométrie en flux de lignées EBV- vs EBV+.	160
Figure 26 : Analyse de l'expression totale de B7-H1 par microscopie confocale, cytométrie en flux et Western-blot dans des lignées EBV- vs EBV+.	162
Figure 27 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de B7-H1 en fonction de l'expression de c-Myc.	164

Figure 28 : Analyse de l'expression membranaire de B7-H1 en fonction de l'expression de c-Myc.	166
Figure 29 : Analyse de l'expression totale de B7-H1 par microscopie confocale, cytométrie en flux et Western-blot dans la lignée P493-6.	168
Figure 30 : Les vecteurs pGl3-pV _H , pRTS1 et pHEBo-pV _H -Luc/Myc-Hhs.....	181
Figure 31 : Séquences du promoteur pV _H et des éléments Hhs1-2 α 1a, Hh3 α 2 et Hhs4.	186
Figure 32 : Synergie entre les éléments de la LCR 3'IgH dans la lignée PRI.	189
Figure 33 : Synergie entre les éléments de la LCR 3'IgH sur la lignée EREB2-5.	191
Figure 34 : Analyse par cytométrie en flux des cellules triées PRI et 1602 EGFP- vs EGFP+.	193
Figure 35 : Cinétique de l'activité transcriptionnelle des éléments Hhs dans la lignée EREB2-5 inducible.....	195
Figure 36 : Lignées PRI et EREB2-5 ppL-Hhs stimulées par le CD40-L.	196
Figure 37 : Suivi des cellules EREB-ppM3124 et EREB-ppM privées en œstrogène.	199
Figure 38 : Modèle de l'infection in vivo des lymphocytes B par l'EBV.	212

Liste des tableaux

Tableau 1 : Translocations impliquant c-myc et pathologies associées.....	51
Tableau 2 : Les conséquences de l'inactivation de c-Myc sur des modèles animaux.	56
Tableau 3 : Mécanismes moléculaires associés à différents types de lymphomes.	89
Tableau 4 : Gènes de l'EBV exprimés en fonction des programmes de latence.	94
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents vecteurs construits.	184

Sommaire

AVANT-PROPOS -----	19
CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -----	25
1. C-Myc : du gène à l'oncogène -----	27
1.1. Structure et régulation de l'expression de c-Myc-----	28
1.1.1. Le gène <i>c-myc</i> -----	28
1.1.2. La protéine c-Myc -----	28
1.1.3. Régulation de l'expression de c-Myc -----	30
1.1.3.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de c-Myc -----	30
1.1.3.2. Régulation post-traductionnelle de l'expression de c-Myc -----	31
1.2. C-Myc : le facteur de transcription -----	32
1.2.1. Les partenaires de c-Myc -----	33
1.2.1.1. Max : partenaire clef-----	33
1.2.1.2. Autres partenaires de c-Myc-----	33
1.2.2. C-Myc en tant qu'activateur transcriptionnel -----	34
1.2.3. C-Myc en tant que répresseur transcriptionnel -----	36
1.3. Les gènes cibles de c-Myc -----	38
1.3.1. Identification des gènes cibles de c-Myc -----	38
1.3.2. Fonction des gènes cibles de c-Myc-----	40
1.3.2.1. Cycle cellulaire et prolifération -----	40
1.3.2.2. Croissance cellulaire et synthèse protéique -----	43
1.3.2.3. Blocage de la différenciation -----	44
1.3.2.4. Adhésion cellulaire et cytosquelette-----	44
1.3.2.5. Métabolisme -----	45
1.3.2.6. Instabilité génomique-----	45
1.3.2.7. Angiogénèse -----	46
1.3.2.8. MicroARN -----	46
1.3.2.9. Apoptose -----	47
1.4. C-Myc et la tumorigenèse-----	50
1.4.1. Mécanismes de la dérégulation de l'expression de c-Myc -----	50
1.4.1.1. A l'échelle du gène -----	50

1.4.1.2.	A l'échelle transcriptionnelle et post-transcriptionnelle-----	52
1.4.1.3.	A l'échelle de la protéine -----	52
1.4.2.	Comment c-Myc transforme la cellule ?-----	53
1.4.2.1.	De la cellule normale à la cellule maligne-----	53
1.4.2.2.	La coopération avec d'autres évènements oncogéniques -----	55
1.4.3.	C-Myc : une cible thérapeutique pour les cancers humains ? -----	56
2.	De la cellule B aux lymphoproliférations B -----	59
2.1.	Le développement B -----	60
2.1.1.	La phase indépendante de l'antigène-----	61
2.1.1.1.	Stade pré-proB-----	62
2.1.1.2.	Stade pro-B -----	63
2.1.1.3.	Stade pré-B-----	64
2.1.1.4.	Stade B immature -----	64
2.1.2.	La phase dépendante de l'antigène -----	65
2.1.2.1.	Structure et développement du centre germinatif -----	65
2.1.2.2.	Stade centroblaste -----	68
2.1.2.3.	Stade centrocyte -----	69
2.1.2.4.	La différenciation des cellules B post-centres germinatifs-----	72
2.1.3.	Zoom sur le locus IgH et la région régulatrice située en 3' du locus -----	74
2.1.3.1.	Description du locus IgH -----	74
2.1.3.2.	Activité transcriptionnelle de la LCR 3'IgH -----	78
2.1.3.3.	Protéines se fixant aux éléments régulateurs de la LCR 3'IgH-----	80
2.1.3.4.	Fonctions de la LCR 3'IgH-----	83
2.2.	Les lymphoproliférations B, le virus d'Epstein-Barr et le lymphome de Burkitt-----	84
2.2.1.	Classification -----	84
2.2.1.1.	Historique -----	84
2.2.1.2.	L'origine cellulaire des lymphomes B -----	85
2.2.2.	Mécanismes de la lymphomagenèse B-----	87
2.2.2.1.	Evènements géniques transformants -----	87
2.2.2.2.	Rôle du BCR dans la lymphomagenèse -----	89
2.2.2.3.	Rôle du microenvironnement tumoral -----	91
2.2.3.	Le virus d'Epstein-Barr -----	92
2.2.3.1.	Biologie de l'EBV -----	93
2.2.3.2.	Les antigènes nucléaires codés par l'EBV (EBNAs) -----	94
2.2.3.3.	Les protéines de latence (LMPs)-----	97

2.2.3.4.	Les autres transcrits latents de l'EBV-----	99
2.2.3.5.	Contrôle de l'infection par le système immunitaire-----	100
2.2.3.6.	Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse B-----	101
2.2.4.	Le lymphome de Burkitt-----	102
2.2.4.1.	Présentation clinique, morphologique et immunophénotypique-----	103
2.2.4.2.	Profil génétique du BL-----	103
2.2.4.3.	Mécanismes mis en jeu lors de la translocation de <i>c-myc</i> -----	105
2.2.4.4.	Mécanismes de la dérégulation de c-Myc-----	105
2.2.4.5.	Le rôle de c-Myc-----	106
2.2.4.6.	Le rôle de l'EBV-----	107

CHAPITRE II : OBJECTIFS ----- 111

CHAPITRE III : RESULTATS ----- 115

1. C-Myc et NF- κ B : deux systèmes transcriptionnels majeurs des cellules B EBV+ en latence III. ----- 117

1.1.	Introduction-----	117
1.2.	Article-----	119
1.3.	Conclusion-----	149

2. Rôles réciproques de c-Myc et de l'EBV dans la régulation de l'expression de B7-H1/CD274/PD-L1.----- 151

2.1.	Introduction-----	151
2.2.	Matériels et méthodes-----	155
2.2.1.	Modèles cellulaires-----	155
2.2.2.	PCR quantitative-----	156
2.2.3.	Cytométrie en flux-----	156
2.2.4.	Microscopie confocale-----	156
2.2.5.	Western-blot-----	157
2.3.	Résultats-----	158
2.3.1.	Augmentation de l'expression des transcrits B7-H1 dans les cellules B EBV+ ----	158
2.3.2.	Augmentation de l'expression de B7-H1 à la membrane des cellules B EBV+ ----	159
2.3.3.	Non influence de l'EBV sur la quantité totale de protéine B7-H1 dans la cellule--	160
2.3.4.	Contrôle transcriptionnel de B7-H1 par c-Myc-----	163
2.3.5.	Répression de l'expression membranaire de B7-H1 par c-Myc-----	165
2.3.6.	Non influence de c-Myc sur la quantité totale de protéine B7-H1 dans la cellule--	167
2.4.	Discussion-----	169

3. Elaboration de nouveaux vecteurs pour l'évaluation du pouvoir transformant d'oncogènes et l'étude de l'activité de régions régulatrices : l'exemple de *c-myc* et de la LCR 3'IgH. ----- 177

3.1. Introduction -----	177
3.2. Matériels et méthodes -----	179
3.2.1. Construction des vecteurs -----	179
3.2.2. Culture cellulaire et transfections -----	182
3.2.3. Analyse et tri cellulaire par cytométrie en flux -----	183
3.2.4. Activité luciférase -----	183
3.2.5. Western-blot -----	183
3.3. Résultats -----	183
3.3.1. Un nouvel outil moléculaire : les vecteurs pHEBo-pV _H -----	183
3.3.1.1. Principe d'élaboration des vecteurs -----	183
3.3.1.2. Vérification et description des inserts -----	184
3.3.2. Synergie entre les éléments régulateurs -----	187
3.3.2.1. Lignée PRI (LCL) -----	187
3.3.2.2. Lignée EREB2-5 (LCL à latence III inducible par l'oestrogène) -----	190
3.3.3. L'activité de la LCR 3'IgH est modulable -----	192
3.3.3.1. Tri des cellules EGFP+ vs EGFP- -----	192
3.3.3.2. Les lignées EREB2-5-pHEBo-pV _H - <i>Luc</i> -----	194
3.3.3.3. Les inducteurs de la LCR 3'IgH -----	196
3.3.4. L'oncogène <i>c-myc</i> sous le contrôle de la LCR 3'IgH -----	197
3.4. Discussion -----	200

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS et PERSPECTIVES ----- 207

1. Discussion générale ----- 209

1.1. Quels sont les mécanismes de "transformation" des EREB ppM3124 ? -----	209
1.2. C-Myc et NF-κB sont-ils opposés dans la transformation ? -----	211
1.3. C-Myc/NF-κB sont-ils anti-immunogène/immunogène ? -----	213

2. Conclusions et perspectives ----- 215

BIBLIOGRAPHIE ----- 217

ANNEXE ----- 249

AVANT-PROPOS

Le terme très ancien de "cancer" désigne un groupe de maladies caractérisé par la présence de tumeurs malignes issues de la transformation par mutations, remaniements du génome ou infection virale d'une cellule initialement normale. Hippocrate (460-370 avant J-C.) fût le premier à utiliser les mots "*carcinosis*" et "*carcinoma*" pour désigner des ulcérations chroniques ou des grosseurs apparentées à des tumeurs malignes. Plus tard Celsus (28 av. J-C – 50 ap. J-C), médecin romain, traduisit le mot grec "*carcinosis*" par "*cancer*", mot latin signifiant crabe, écrevisse, cancre. Puis, Galien (130-200) utilisa le terme "*oncos*" pour désigner une grosseur ou tumeur d'allure maligne. Enfin, au début du XIX^{ème} siècle, "*carcinoma*" devint synonyme de "cancer". Ce mot n'a pas de réelle signification scientifique puisqu'il est attribué à un grand nombre de maladies, avec des étiologies et des manifestations très variées. Les tumeurs donc sont classées selon leur contre-partie normale, leur présentation clinique, leur localisation et leur aspect morphologique, mais également selon leur phénotype et leurs altérations géniques. Leurs noms se composent d'une racine (définissant le tissu d'origine) et d'un suffixe (définissant le type de prolifération). Généralement, le suffixe "*-oma*" est associé à des tumeurs bénignes isolées et le suffixe "*-matose*" à des tumeurs multiples ou diffuses. Cependant, il existe des exceptions, telles que le lymphome ou le mélanome qui sont toujours, par définition, des tumeurs malignes.

La tumorigenèse (ou apparition de tumeurs) est un processus multi-étapes reflétant des altérations génétiques d'une cellule normale aboutissant à sa transformation progressive en une cellule maligne. L'observation de cancers, soit humains, soit de modèles animaux, montrent qu'une succession de changements, chacun conférant à la cellule un avantage prolifératif et/ou une résistance à l'apoptose (mort cellulaire programmée), permet la conversion progressive de la cellule normale en une cellule cancéreuse qui échappe donc aux processus d'homéostasie. Deux grandes familles de gènes sont associées aux pathologies cancéreuses : les oncogènes (ou proto-oncogènes), régulateurs positifs de la prolifération cellulaire (par exemple : *ras*, *myc*, *abl*) et les gènes suppresseurs de tumeurs, régulateurs négatifs de la prolifération, impliqués dans l'induction de l'apoptose (par exemple : *pRB*, *p53*, *p19^{ARF}*).

Le lymphome est un terme générique attribué historiquement aux proliférations malignes des tissus lymphoïdes. Actuellement, ce mot désigne des cancers dérivés des lymphocytes, acteurs majeurs du système immunitaire. Bien que dépendant du type de lymphomes, souvent, les cellules cancéreuses n'envahissent pas la circulation sanguine, mais ciblent les tissus, en particulier les ganglions lymphatiques. Le lymphocyte B intervient à plusieurs niveaux dans la réponse immune. D'une part il est impliqué dans la réponse dite à médiation humorale, de par sa capacité à fabriquer

des molécules dirigées contre le non-soi : les immunoglobulines (ou anticorps) dirigées contre les antigènes. D'autre part le lymphocyte B est impliqué dans la réponse à médiation cellulaire, jouant le rôle d'une cellule présentatrice de l'antigène aux lymphocytes T. Lors de la réponse immune, le lymphocyte B est soumis à de nombreuses étapes de différenciation lui permettant de produire des anticorps de haute affinité dirigés contre un antigène. De fait, son génome est la cible de multiples mutations et remaniements des gènes des immunoglobulines, pouvant parfois aboutir accidentellement à une expansion clonale maligne. D'autres mécanismes génétiques de transformation sont également possibles, tels les pertes ou les gains de chromosome, ou l'infection par le virus d'Epstein-Barr pour le lymphocyte B ou par le rétrovirus HTLV1 pour les lymphocytes T CD4.

Le lymphome de Burkitt, décrit en 1958, est un modèle qui, dans l'histoire de la biologie, a permis de mettre en évidence deux des grands phénomènes pouvant causer des dérégulations aboutissant à la lymphoprolifération B. Tout d'abord, ce type de lymphome peut être associé à la présence d'un virus au sein des cellules : le virus d'Epstein-Barr (EBV). Ce virus, de la famille des *herpès-virus*, est directement transformant pour le lymphocyte B, cellule qu'il cible préférentiellement. Ce virus est associé à plusieurs types de lymphoproliférations B, comme la maladie de Hodgkin, par exemple. De plus, la marque des lymphomes de Burkitt est la translocation de l'oncogène cellulaire *c-myc* au niveau d'un des locus des gènes d'immunoglobulines, induisant la surexpression inappropriée de la protéine c-Myc, responsable d'une prolifération incontrôlée des cellules.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle de c-Myc dans le modèle du lymphocyte B infecté par le virus d'Epstein-Barr.

Dans une première partie bibliographique, nous ferons un état des lieux sur le proto-oncogène *c-myc*. Nous étudierons sa régulation et ses cibles cellulaires avant d'essayer de comprendre comment ce gène est dérégulé dans les cancers. Puis, nous nous intéresserons spécifiquement à la cellule B et ses étapes de différenciation, en étudiant particulièrement le locus des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines, dans lequel *c-myc* est transloqué dans 80% de lymphomes de Burkitt. Nous finirons par une étude des lymphoproliférations B et par la compréhension des mécanismes qui en sont à l'origine. Nous considérerons également le rôle du virus d'Epstein-Barr dans les hémopathies malignes avant de terminer par la description du lymphome de Burkitt.

La deuxième partie présente les résultats obtenus au cours de mes travaux de recherche. Nous avons dans un premier temps voulu savoir si et comment c-Myc est impliqué dans la prolifération des cellules B infectées par l'EBV en latence III. De ce travail, nous avons initié l'étude des rôles réciproques de c-Myc et de l'EBV dans la régulation de l'expression de la molécule B7-H1, molécule co-inhibitrice de la réponse immune. En parallèle de ces travaux, nous avons élaboré un nouvel outil moléculaire permettant d'apprécier le rôle de la région régulatrice située en 3' des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines dans la transformation des cellules B, en prenant comme exemple l'oncogène *c-myc*.

Enfin, une discussion générale puis une conclusion à ces travaux permettront de faire la synthèse des faits démontrés tout au long de ce travail de recherche.

CHAPITRE I : INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

1. C-MYC : DU GENE A L'ONCOGENE

Le proto-oncogène *c-myc*, codant le facteur de transcription c-Myc, a été identifié comme l'homologue cellulaire de l'oncogène viral *v-myc* du virus de la myélocytomatose aviaire MC29 (Vennstrom et al., 1982). Peu après, il a été montré que c-Myc est impliqué dans le lymphome de Burkitt (BL), pathologie dans laquelle cet oncogène est transloqué entre le chromosome 8 et l'un des trois gènes codant les immunoglobulines (Taub et al., 1982). Depuis, une expression élevée ou dérégulée de c-Myc a été détectée dans un grand nombre de cancers humains tels que les cancers du sein, du colon, du col de l'utérus, les ostéosarcomes, les glioblastomes ou encore les mélanomes (Pelengaris et al., 2002a).

Le facteur de transcription c-Myc est un régulateur clef de nombreuses activités biologiques et son expression est très finement régulée ; une dérégulation de son expression peut aboutir tout autant à l'apoptose, l'instabilité génomique, une prolifération cellulaire incontrôlée, l'échappement à la surveillance immunitaire ou encore l'immortalisation (cf. **Figure 1**) (Vita and Henriksson, 2006).

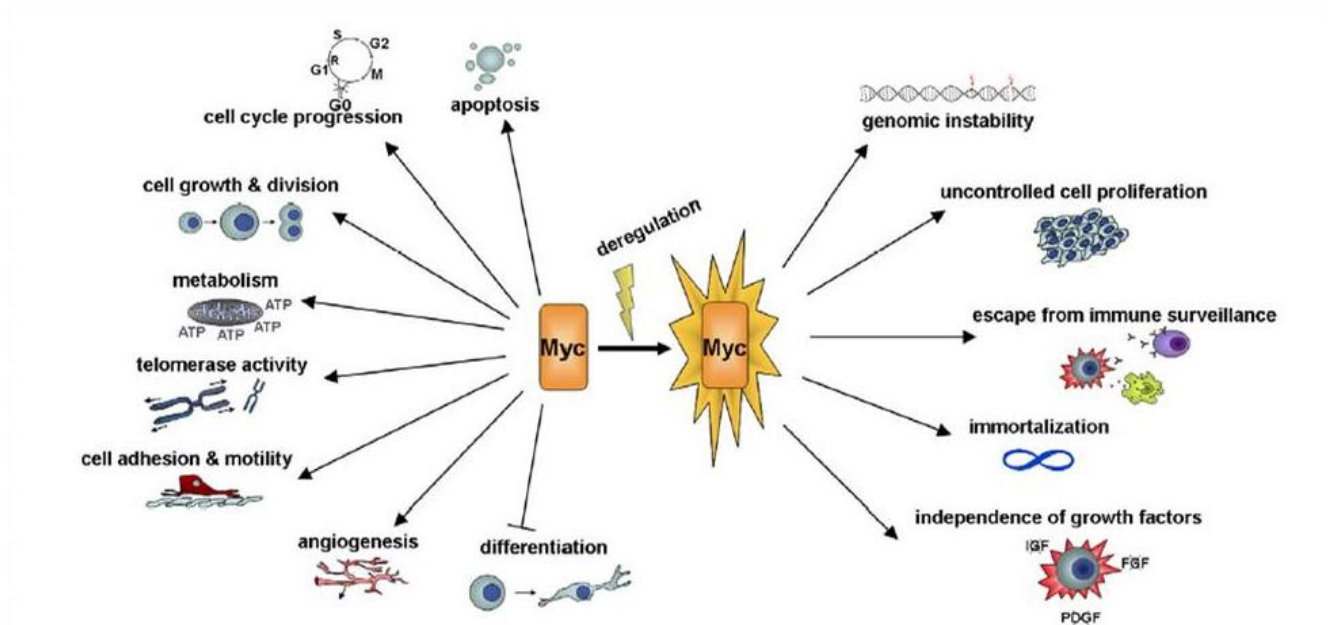


Figure 1 : Processus cellulaires contrôlés par *c-Myc* dans des conditions normales et lors de la tumorigénèse.

(Vita and Henriksson, 2006).

Suite à la découverte de *c-myc*, deux autres gènes de la famille MYC ont été identifiés chez l'homme : *L-Myc* (caractérisé dans une lignée tumorale issue du poumon (L pour *Lung*), dont l'expression est restreinte à certains tissus embryonnaires et au tissu pulmonaire adulte) et *N-Myc* (caractérisé à partir d'un neuroblastome, exprimé dans certains tissus embryonnaires). Tous les trois ont comme produit protéique des facteurs de transcription qui ont la capacité de se lier aux séquences *E-box* dans le promoteur de leurs gènes cibles (Blackwell et al., 1990). Ils sont également capables de transformer les cellules, cependant *c-Myc* reste le plus étudié car il présente une plus grande capacité de transformation dans les essais *in vitro* (Nesbit et al., 1999).

Dans ce chapitre, nous allons exposer tout d'abord comment *c-Myc* est régulé puis dans un second temps, par quels mécanismes il régule à son tour ses nombreuses cibles, et enfin, nous verrons comment la dérégulation de son expression peut aboutir à la tumorigenèse.

1.1. Structure et régulation de l'expression de c-Myc

1.1.1. Le gène *c-myc*

Le gène *c-myc*, localisé sur le chromosome 8, comprend trois exons. Le premier (exon I) est non-codant, les deux autres (exons II et III) codent la protéine *c-Myc*. Le gène humain possède quatre promoteurs : P0, P1, P2 et P3. P0 est localisé dans la région 5' non traduite, les promoteurs P1 et P2 se situent dans l'exon I et le promoteur P3 se trouve dans l'intron I (cf. **Figure 2**). Dans les cellules normales, la majorité des transcrits sont initiés à partir des promoteurs P1 et P2 (contenant chacun une boîte consensus TATA), avec une large prédominance pour le promoteur P2. Effectivement, 75 à 90% des transcrits sont initiés à partir de P2 (2.2 kb), 10 à 25 % à partir de P1 (2.4 kb) et enfin, moins de 5% à partir de P0 et P3 (Facchini and Penn, 1998; Wierstra and Alves, 2008).

1.1.2. La protéine c-Myc

Le produit du gène *c-myc* est une phosphoprotéine nucléaire hautement conservée. Les transcrits initiés à partir des promoteurs P1 et P2 codent pour les deux espèces majeures de la protéine *c-Myc* humaine : respectivement Myc1 (67 kDa) et Myc2 (64 kDa). D'une façon générale, les deux protéines sont exprimées. Cependant, dans les lignées de cellules tumorales portant une altération au locus *c-myc* (amplification du gène ou translocation), une augmentation de l'expression de p64 par rapport à p67 en comparaison de cellules normales ou de cellules immortalisées par le virus d'Epstein-Barr, est observée (Hann and Eisenman, 1984).

L'oncoprotéine c-Myc est un facteur de transcription organisé en trois grands domaines (Facchini and Penn, 1998) (Ryan and Birnie, 1996), comme représenté sur la **Figure 2** :

✓ Un domaine d'activation de la transcription (TAD) dans sa partie amino-terminale contenant deux éléments très conservés: MYC Box I (MBI, résidus 45 à 63) et MYC Box II (MBII, résidus 129 à 143), essentiels pour la transactivation des gènes cibles.

✓ Une région centrale contenant une séquence de localisation nucléaire NLS (résidus 320 à 328), ainsi que deux autres MYC Box, récemment identifiées : MBIII (résidus 188 à 199), qui joue un rôle dans la transformation cellulaire (Herbst et al., 2005) et MBIV (résidus 295 à 315), impliqué à la fois dans la liaison à l'ADN, l'apoptose, la transformation et l'arrêt du cycle en G2 (Cowling et al., 2006).

✓ Un domaine carboxy-terminal, constitué d'une région basique (BR, résidus 354 à 367) impliquée dans la reconnaissance et la liaison à des séquences spécifiques d'ADN ; d'un motif HLH (*Helix-Loop-Helix*, résidus 368 à 407) et d'un motif Zip (*Leucine Zipper*, résidus 413 à 434) ; ces deux derniers motifs permettant la formation d'hétérodimères entre c-Myc et son partenaire Max, hétérodimères se fixant sur des séquences d'ADN spécifiques, les *E-box*.

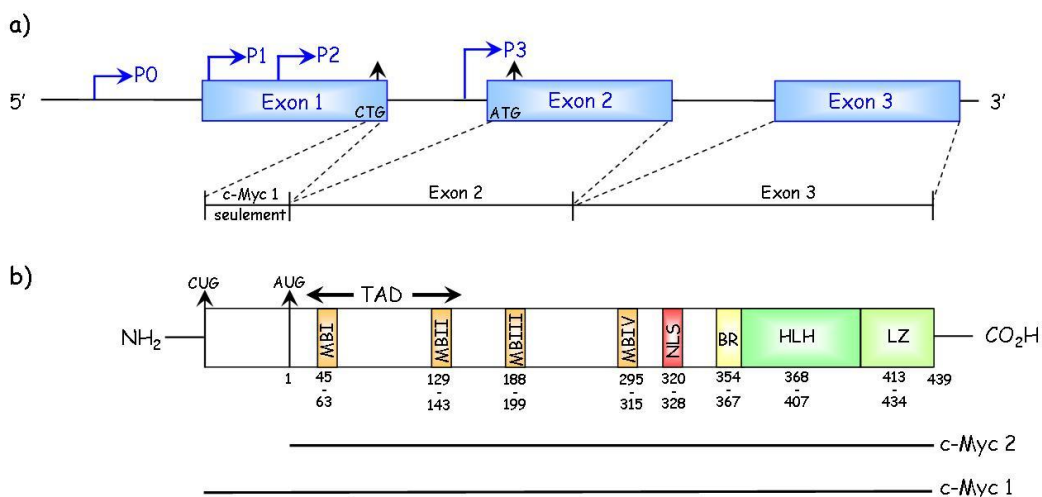


Figure 2 : Représentation schématique de la structure du gène *c-myc* et des deux protéines résultantes.

a) : Le gène *c-myc* comprenant trois exons et quatre promoteurs.

b) : Les différents domaines du facteur de transcription sont représentés : le Domaine de Transactivation (TAD), les MYC Box (MB I, II III et IV), la Séquence de Localisation Nucléaire (NLS), Le Domaine Basique (BR), le Domaine Helix-Loop-Helix (HLH) et le Domaine Leucine Zipper (LZ).

D'après (Ryan and Birnie, 1996) et (Facchini and Penn, 1998).

1.1.3. Régulation de l'expression de c-Myc

De façon générale, l'expression de c-Myc est étroitement corrélée avec le potentiel prolifératif de la cellule. Dans les cellules quiescentes, l'expression de c-Myc est quasi-indéetectable. En revanche, suite à une stimulation mitogénique, une augmentation rapide et transitoire du transcrit et de la protéine c-Myc des cellules entrant en phase G1 est observée, suivie d'une diminution progressive de son expression, mais détectable, dans les cellules proliférantes. Cette induction de la transcription ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo*, puisque les taux maximum d'ARNm sont atteints 2 heures après traitement avec un mitogène, en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) ; on parle alors de gène précoce de la prolifération cellulaire (*Immediate-Early Gene* ou IEG) (Kelly et al., 1983). De nombreux mécanismes coopèrent afin de réguler ce gène et permettre une expression rapide et efficace, modulée en réponse à des signaux internes ou externes.

1.1.3.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de c-Myc

Le locus *c-myc* est flanqué de deux MARs (*Matrix Associated Regions*) qui forment une boucle (*loop*) et séparent le gène des gènes voisins. Le promoteur et les séquences se trouvent dans une région d'euchromatine, caractérisée par l'hyperacétylation des histones H3 et H4. En amont du gène, séparant les régions d'hétérochromatine et d'euchromatine se trouve un élément isolateur : MINE (*c-Myc Insulator Element*), comprenant un élément de liaison au facteur CTCF (*CCCTC-binding Factor*). Différents facteurs de transcription recrutant des HAT (*Histone Acetyl Transferase*) ou des HDAC (*Histone Deacetylase*) au niveau du promoteur de *c-myc* ont été décrits, influençant le statut d'acétylation des histones, et sont répertoriés dans la revue suivante : (Wierstra and Alves, 2008). Une autre modification transcriptionnelle affectant le locus *c-myc* est la méthylation. Ainsi, par exemple, le locus *c-myc* est hyperméthylé et le gène est silencieux dans la lignée de cellules leucémiques K562 induites pour leur différenciation. A l'inverse, le locus est hypométhylé dans les cancers gastriques, lignée cellulaire en prolifération continue (Wierstra and Alves, 2008).

Une multitude de voies de signalisation régule également le promoteur comme celles induites par des cytokines (Il-2, Il-3, IFN- γ , TNF), des signaux prolifératifs (stimulation par un mitogène), des facteurs de croissance (PDGF), des hormones (EPO, oestrogène). De fait, l'activité du promoteur est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription pouvant se fixer et induire ou

non la transcription du gène. Parmi ceux-ci, on peut citer les protéines STAT, E2F, NF- κ B¹ comme régulateurs positifs, et les protéines Smad, C/EBP α , Blimp1, p53 comme régulateurs négatifs. Cependant, une même famille de facteurs peut réguler positivement ou négativement le gène, selon les sous-unités impliquées (cas de NF- κ B : les dimères RelB/p52, p65/p50 ou la surexpression de p65 active le promoteur de *c-myc*, alors que le dimère p50/p50 ou la surexpression de p50 le réprime) ou selon la protéine (cas de la famille STAT : STAT1 inhibe *c-myc*, alors que STAT3, 4 ou 5 l'active). De plus, le résultat de la cascade de signalisation engendrée par un stimulus dépend étroitement du type cellulaire et de l'état de différenciation/prolifération de la cellule. (Wierstra and Alves, 2008).

Enfin, il a été montré que la protéine c-Myc réprime elle-même son propre promoteur (P2) au niveau de l'initiation de la transcription. Cet effet nécessite l'hétérodimérisation avec son partenaire Max mais le complexe ne se lie pas au niveau des séquences *E-Box*, puisque le promoteur de *c-myc* en est dépourvu. (Facchini et al., 1997). Une étude a montré que l'autorépression de c-Myc nécessite à la fois les sites Inr (éléments initiateurs) et E2F en *cis* et le facteur p107 en *trans* (Luo et al., 2004). Cependant, peu de données quant à la mécanistique sont disponibles alors que cette boucle de régulation négative est un mécanisme de contrôle important puisque cette autorépression est perdue dans de nombreuses lignées tumorales (Penn et al., 1990a; Facchini et al., 1997; Facchini and Penn, 1998; Wierstra and Alves, 2008).

1.1.3.2. Régulation post-traductionnelle de l'expression de c-Myc

La régulation de l'activité de la protéine c-Myc se produit également au niveau post-traductionnel, par des mécanismes directs (phosphorylation, glycosylation, ubiquitination) ou indirects (interactions avec d'autres protéines cellulaires, cf. 1.2.1), pouvant augmenter ou diminuer son activité.

¹ Le terme générique NF- κ B résulte d'un abus de langage, souvent utilisé par de nombreux auteurs. Ce terme a plusieurs sens et peut désigner alternativement l'activité de liaison aux sites κ B d'un facteur transcriptionnel, l'activation NF- κ B par la voie canonique (classique) ou non-canonique (alternative) (cf. 2.2.3.3), les complexes NF- κ B (principalement p65/p50 pour la voie classique et RelB/p52 pour la voie alternative) et enfin l'activité transcriptionnelle NF- κ B définie par l'expression d'un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur comportant des sites κ B. Aussi souvent que possible, nous tâcherons d'éclaircir le sens de ce terme mais, par souci de simplicité, nous utiliserons fréquemment cet abus de langage.

En effet, c-Myc peut être phosphorylée sur une quinzaine de sites Sérine ou Thréonine : Thr⁵⁸, Ser⁶², Ser⁷¹, Ser⁸² et Ser¹⁶⁴ en N-terminal, Ser²⁹³, Thr³⁴³, Ser³⁴⁴, Ser³⁴⁷ et Ser³⁴⁸ en C-terminal, ainsi qu'une série de 5 sites au niveau des résidus 240 à 262 et enfin sur 5 autres sites en C-terminal qui sont Ser²⁹³, Thr³⁴³, Ser³⁴⁴, Ser³⁴⁷ et Ser³⁴⁸ (Facchini and Penn, 1998). Les sites Thr⁵⁸, Ser⁶² apparaissent les plus pertinents et sont surtout les plus étudiés puisqu'ils sont localisés dans le domaine de transactivation TAD (point chaud de mutations dans les cellules de lymphome de Burkitt). La phosphorylation de ces deux sites est régulée par la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). De plus, Thr⁵⁸ une cible de GSK (*Glycogen Synthase Kinase 3*) et la phosphorylation sur ce résidu nécessite la phosphorylation préalable de Ser⁶². Ser⁶² est aussi la cible de kinases du cycle cellulaire, les CDK (*Cyclin Dependant Kinase*) (Hann, 2006).

De plus, il a été montré que la protéine c-Myc peut également être glycosylée sur le résidu Thr⁵⁸. Il s'agit d'une glycosylation de type O, ayant pour motif sucré : N-acétylglucosamine (O-GlcNAc). D'autres sites de glycosylation ont été décrits dans le domaine de transactivation TAD (Chou et al., 1995a; Chou et al., 1995b).

Enfin, la dégradation de c-Myc implique la voie ubiquitine-protéasome. Deux complexes d'ubiquitine ligase ciblent c-Myc : Skp2 et Fbw7. L'ubiquitination par le facteur Fbw7 requiert que la protéine c-Myc soit phosphorylée en Thr⁵⁸ (Welcker et al., 2004). Les sites de liaison pour les ligases sont globalement localisés dans la Myc Box II (résidus 127 à 158) (Hann, 2006).

1.2. C-Myc : le facteur de transcription

C-Myc régule de nombreux gènes en formant un complexe hétérodimérique avec son partenaire Max, qui peut reconnaître et se lier à des séquences d'ADN spécifiques : les éléments *E-box* (CANNTG). Ces séquences fixent des facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (bHLH). La spécificité de liaison est déterminée par la nature de l'homodimère ou de l'hétérodimère formé par les facteurs à domaine bHLH et par les nucléotides en troisième et quatrième position de la séquence *E-box*. Des études *in vivo* ont montré que les hétérodimères Myc-Max se liaient préférentiellement à la séquence CACA/GTG (Blackwood et al., 1992).

1.2.1. Les partenaires de c-Myc

1.2.1.1. Max : partenaire clef

En 1991, l'équipe d'Eisenman a identifié une protéine à domaine BR-HLH-Zip, ayant une forte affinité de liaison pour c-Myc : la protéine Max. (Blackwood and Eisenman, 1991).

Max est une phosphoprotéine nucléaire conservée. L'épissage alternatif de son pré-ARNm permet l'expression de deux isoformes majeures de la protéine : Max p21 (forme courte) et Max p22 (forme longue). D'un point de vue structural, Max possède une NLS et un domaine BR-HLH-Zip mais ne possède pas de domaine de transactivation. La protéine Max est présente en excès par rapport à c-Myc et, à l'inverse de c-Myc, son expression est abondante et constante dans les cellules quiescentes ou proliférantes et ne répond pas aux mitogènes (Blackwood et al., 1992). Les interactions Myc-Max permettent à c-Myc de jouer ses rôles clefs dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, son autorégulation, ou la transformation cellulaire (Amati et al., 1993b; Facchini et al., 1997).

Un variant protéique de Max, dMax, a été isolé à partir d'extraits nucléaires de fibroblastes NIH 3T3. Ce variant résulte d'un épissage alternatif du pré-ARNm de *max* et présente une délétion de 108 pb supprimant les régions basiques, l'hélice et le domaine boucle. Cette protéine dMax se lie à c-Myc avec une forte affinité, probablement par son domaine Zip, intact ; mais ces complexes c-Myc-dMax ne se lient pas aux séquences *E-Box*. Des expériences de cotransfection dans cette même lignée ont permis de montrer que dMax est un dominant négatif naturel de c-Myc (Arsura et al., 1995).

Max peut également former des homodimères et des hétérodimères avec d'autres membres de la famille des protéines à domaine BR-HLH-Zip tels que Mad1, Mad3, Mad4, Mxi1 (ou Mad2) et Mnt1. Les homodimères Max et les complexes Mad-Max, Mxi1-Max ou Mnt1-Max entrent en compétition pour l'occupation des sites *E-box* reconnus par Myc-Max et s'opposent à l'activité des complexes Myc-Max (Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1993; Hurlin et al., 1995; Hurlin et al., 1997).

1.2.1.2. Autres partenaires de c-Myc

C-Myc peut se lier à de nombreuses autres protéines à travers ses domaines carboxy et amino terminaux. Des interactions ont été montrées *in vitro* et *in vivo* entre le domaine TAD de c-Myc et la protéine TRAAP (*transformation/transcription domain-associated protein* ; permettant le

recrutement d'une HAT), le suppresseur de tumeur p107 (dont la liaison au TAD de c-Myc supprime son activité) et la protéine TBP (*TATA Binding Protein*, suggérant une interaction entre c-Myc et la machinerie basale de transcription) (Gu et al., 1994; Maheswaran et al., 1994; Alexandrova et al., 1995; Sakamuro et al., 1996; McMahon et al., 1998; McMahon et al., 2000). En outre, c-Myc peut former des complexes à travers son domaine BR-HLH-Zip avec les facteurs de transcription YY-1 (*Yin Yang-1*, c-Myc l'inhibant), AP-2 (qui inhibe c-Myc) et Miz-1 (*Myc interacting zinc finger protein*). (Shrivastava et al., 1993; Gaubatz et al., 1995; Bao and Zervos, 1996). Enfin, *in vitro*, des expériences ont montré que c-Myc pouvait également se lier à la protéine TFII-I (rôle dans l'initiation de la transcription) et pRb (coopération dans le contrôle de la prolifération cellulaire) (Rustgi et al., 1991; Roy et al., 1993).

1.2.2. C-Myc en tant qu'activateur transcriptionnel

Suite à la caractérisation de la séquence *E-box* (CACGTG) comme site préférentiel pour la liaison de protéines à domaine BR-HLH, des études ont été conduites afin de montrer si cette séquence était une cible de c-Myc (cf. **Figure 3**). Cette hypothèse a été démontrée en co-exprimant Myc et Max dans un système de gène rapporteur chez la levure, où le gène de la β -galactosidase est placé sous le contrôle d'un promoteur basal ayant la séquence CACGTG. Une forte augmentation de l'expression du gène de la β -galactosidase a été observée. Les auteurs ont montré que le niveau d'activation du gène dépend non seulement du niveau d'expression de c-Myc mais également de la présence du domaine de transactivation de la protéine. De plus, ni c-Myc seule, ni les homodimères Max n'activent le gène rapporteur. Les homodimères Max se lient bien à la séquence mais sans induire l'expression du gène. Si Max est exprimé à un plus fort niveau que c-Myc, l'activité du gène de la β -galactosidase est moindre que lorsque les deux partenaires sont exprimés de façon équivalente, révélant que Max a une plus forte affinité pour le domaine HLH de c-Myc que pour le sien (Amati et al., 1992). Il en résulte que l'activité des gènes régulés par c-Myc n'est pas seulement dépendante du niveau d'expression de c-Myc mais également de celui de Max. L'année suivante, ces mêmes auteurs ont montré que l'hétérodimérisation entre Myc et Max est essentielle au pouvoir transformant de c-Myc (Amati et al., 1993a).

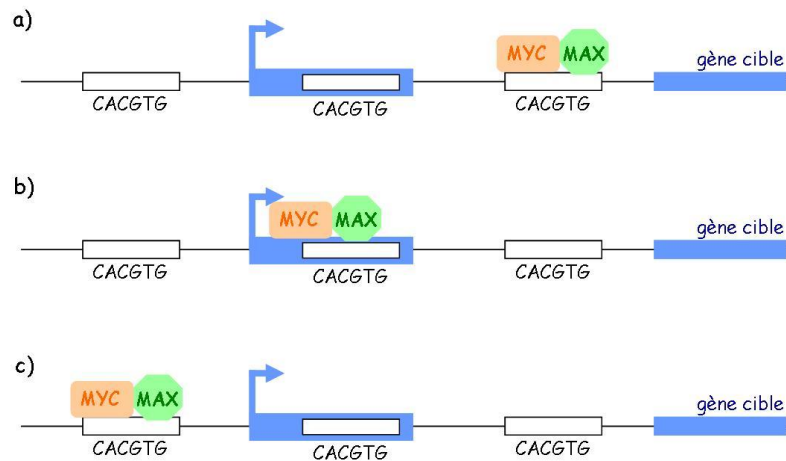


Figure 3 : Localisation des séquences E-Box.

C-Myc active la transcription en formant des hétérodimères avec la protéine Max afin de se lier aux séquences E-box, CACGTG. Ces séquences peuvent se trouver dans un intron du gène cible (a), dans un exon (b) ou en 5' de la région promotrice (c). D'après (Facchini and Penn, 1998).

A la fin des années 90, l'équipe de McMahon a identifié une nouvelle protéine : TRRAP, se fixant sur la MBII de c-Myc. Ce cofacteur permet le recrutement d'une histone acétyl transférase, hGCN5, qui induit la transcription du gène cible (McMahon et al., 2000). De plus, il s'avère que c-Myc interagit également avec la protéine INI1 qui fait partie du complexe de remodelage de la chromatine SWI-SNF (Cheng et al., 1999). En 2006, l'équipe d'Eisenman a montré que c-Myc peut réguler la structure chromatinienne puisque des mutations ne permettant plus l'expression de c-Myc entraînent des changements dans la méthylation et l'acétylation des histones aboutissant à une diminution de l'accessibilité de l'ADN ainsi qu'à une augmentation des régions hétérochromatiques (Knoepfler et al., 2006).

Pour finir, il a été démontré que c-Myc peut augmenter la transcription en permettant le recrutement P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor*), qui phosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN polyméraseII. En effet, l'ARN polII subit un cycle de phosphorylation/déphosphorylation durant la transcription (phosphorylation lors des phases d'initiation et d'élongation et déphosphorylation lors de la phase de terminaison). Suite à sa phosphorylation sur Ser⁵, et après avoir transcrit de 20 à 40 bases, elle s'arrête. Le recrutement de P-TEFb par c-Myc va permettre la phosphorylation de l'ARN polII sur Ser² et par conséquent l'élongation de la transcription. (Cowling and Cole, 2006). Ainsi, c-Myc agit sur l'initiation et sur l'élongation de la transcription (cf. **Figure 4** et **Figure 5**).

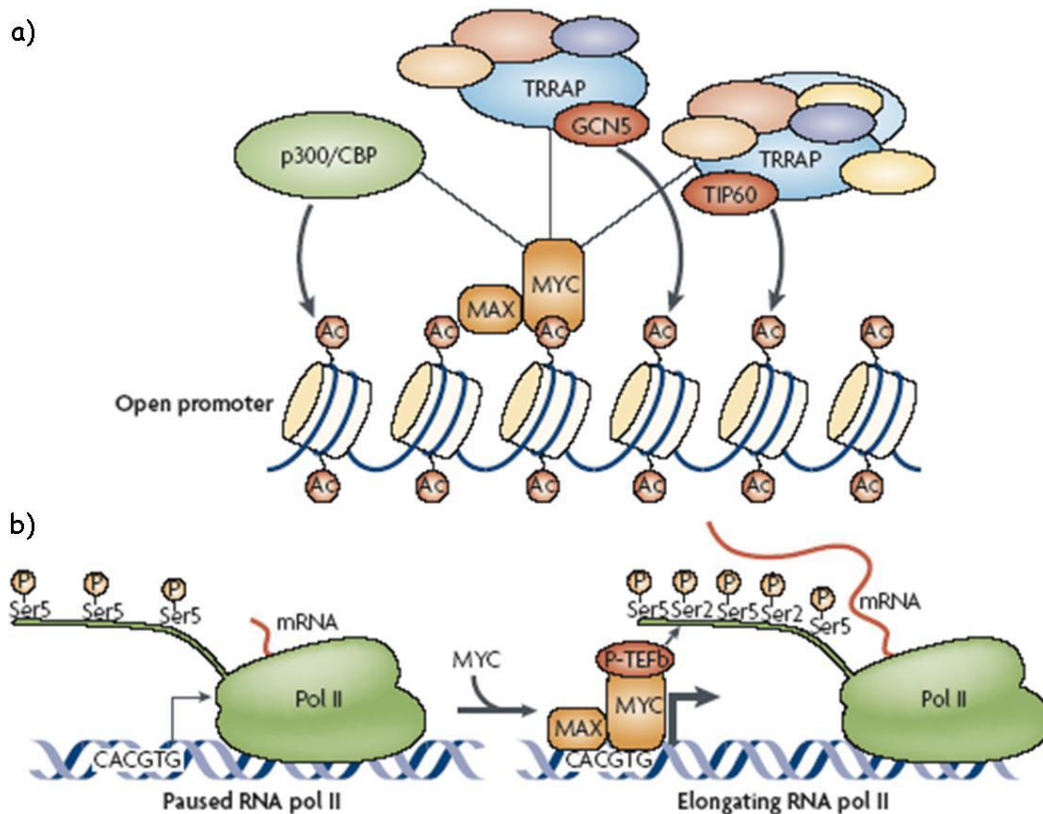


Figure 4 : Mécanismes d'induction de la transcription par c-Myc.

a) : Le complexe Myc-Max reconnaît les séquences E-Box. C-Myc recrute des HAT (hGCN5 et TIP60) et la protéine CBP (p300/CREB binding protein), permettent l'acétylation des nucléosomes. L'acétylation des histones autour du gène cible de c-Myc permet le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (non représenté).

b) : C-Myc augmente la transcription en recrutant le complexe P-TFEB qui phosphoryle la Ser² de l'ARN polII et permet l'élongation de la transcription.

(Cole and Cowling, 2008).

1.2.3. C-Myc en tant que répresseur transcriptionnel

Au début des années 80, il a été observé dans des cellules de lymphomes de Burkitt que l'expression de *c-myc* sur l'allèle transloqué est constitutive, alors qu'elle est souvent indétectable sur l'allèle non transloqué. Dans la décade suivante, l'équipe de Land a montré que l'expression exogène de c-Myc à l'aide d'un rétrovirus supprime l'initiation de la transcription de *c-myc* endogène, de façon dose-dépendante (Penn et al., 1990a). Ces résultats suggéraient que c-Myc participe à une boucle d'autorégulation négative. L'analyse structure-fonction de la protéine a permis de montrer que les domaines impliqués dans son autosuppression sont deux domaines hautement conservés (acides aminés 106 à 143 du domaine de transactivation et acides aminés 354 à 433 des domaines b-HLH-LZ) (Penn et al., 1990b). En outre, ce mécanisme d'autorégulation

négative a été mis en évidence dans de nombreux autres types cellulaires. En 1990, l'équipe de Dalla-Favera a confirmé ce fait en testant l'autorégulation de *c-myc* mis sous le contrôle d'un promoteur inductible. 11 types cellulaires sur 11 testés (des cellules non-tumorales, des cellules B immortalisées ou non et des fibroblastes) répondent au mécanisme d'autorégulation, alors que ce processus est inactif dans des lignées dérivées de tumeurs de différents tissus (Grignani et al., 1990).

De ce fait, l'idée que c-Myc peut réprimer la transcription de gènes cibles a alors émergée. C'est ainsi qu'en 1994, l'équipe de Ziff a montré que c-Myc réprime la transcription par un mécanisme dépendant des éléments initiateurs (Inr) de la région promotrice basale du gène cible. Les régions MBII et b-HLH-LZ sont essentielles à cet effet (Li et al., 1994). L'interaction de c-Myc avec son partenaire Max pourrait également être un mécanisme par lequel il réprime la transcription de certains de ces gènes cibles (Mao et al., 2003). Le complexe Myc-Max interagit avec des activateurs transcriptionnels liés à l'ADN (NFY, SP1 ou MIZ1), aboutissant d'une part à la rupture de liaison entre ces protéines et des activateurs comme MIZ1 et p300, et d'autre part au recrutement de co-répresseurs transcriptionnels comme DNMT3a, une ADN méthyltransférase (Adhikary and Eilers, 2005; Kleine-Kohlbrecher et al., 2006). Les principaux mécanismes par lesquels c-Myc ou le complexe Myc-Max peuvent réprimer la transcription sont décrits sur la **Figure 5**.

Depuis, le nombre de gènes cibles pouvant être réprimé par c-Myc ne cesse d'augmenter. Parmi eux, il a été prouvé qu'une forte expression de la protéine c-Myc régule négativement la transcription des gènes C/EBP α , celle de l'albumine, de la cycline D1, de tDt, *gadd45*, IgE μ , Ig κ ou encore de PDGFR et des gènes de réponse aux interférons. (Facchini and Penn, 1998; Schlee et al., 2007a).

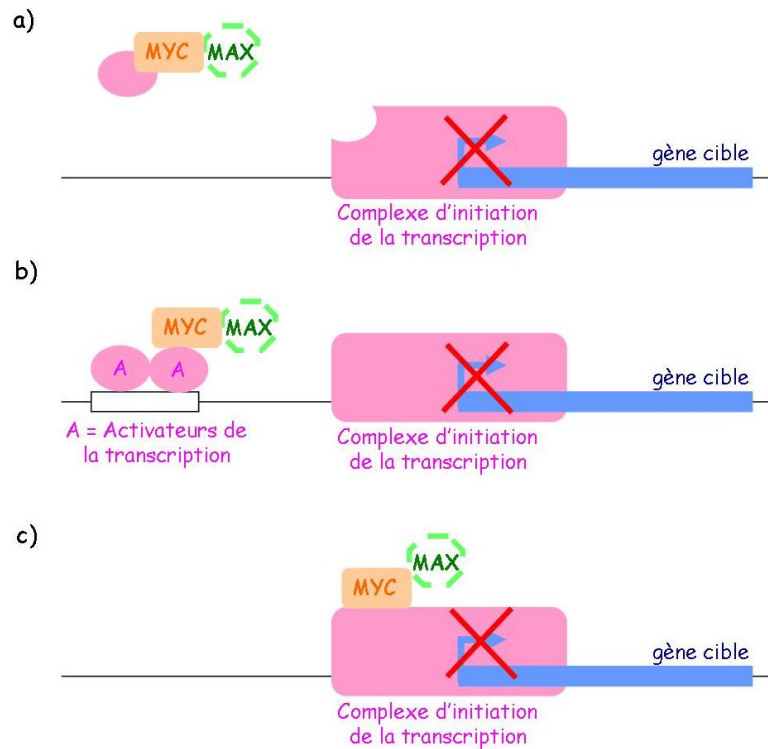


Figure 5 : Mécanismes de répression de la transcription par c-Myc.

Ce mécanisme peut être dépendant ou indépendant de Max. C-Myc (ou Myc-Max) peut lier et séquestrer un élément essentiel de la machinerie de transcription (a), inhiber l'activité d'éléments régulateurs en amont du gène (b) ou se lier directement au complexe d'initiation de la transcription et l'inhiber (c). D'après (Facchini and Penn, 1998).

1.3. Les gènes cibles de c-Myc

1.3.1. Identification des gènes cibles de c-Myc

La plupart des modèles utilisés pour étudier les gènes cibles de c-Myc reposent sur la réponse aux changements de son expression. Par exemple, dans un modèle de privation de sérum et de réinduction, une augmentation rapide de l'expression de c-Myc est observée juste après la réintroduction de sérum. L'expression des gènes cibles peut alors être analysée en mesurant les niveaux d'ARN ou de protéines qui répondent aux changements d'expression de c-Myc. Des systèmes de gènes rapporteurs ou des expériences de gel retard (EMSA) ont également été utilisés afin d'identifier ces gènes cibles, mais les constructions ne reflètent pas le contexte chromatinien des gènes potentiellement cibles, *in vivo*.

Le système développé par Eilers en 1989 permet d'étudier les cibles de c-Myc. Le gène *c-myc* humain a été fusionné avec le domaine de liaison de l'hormone du récepteur à l'œstrogène (ER). La

protéine qui en résulte lie l'œstrogène avec une forte affinité (MycER). L'activation de cette protéine de fusion permet aux cellules quiescentes de progresser dans le cycle cellulaire (Eilers et al., 1989). De nombreuses cibles de c-Myc ont pu être identifiées avec cette approche. La modification du domaine de liaison de l'hormone par l'équipe d'Evan, qui a créé une protéine de fusion répondant au Tamoxifen (Myc-ER^{TAM}) a permis l'utilisation de ce système *in vivo* (Littlewood et al., 1995). Cette stratégie est encore largement utilisée de nos jours et a été élargie à de nombreuses protéines afin d'étudier leur cibles transcriptionnelles, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Picard, 2000).

Le développement de la technique utilisant les puces à ADN (*microarrays*), a permis une analyse à grande échelle des gènes potentiellement régulés par c-Myc. L'un des premiers buts fut d'identifier des groupes de gènes fonctionnant de façon coordonnée pour réguler une même fonction biologique. De très nombreuses cibles, directes ou indirectes de l'activité de c-Myc ont pu être mises en évidence. En 2003, l'équipe de Dang a ainsi développé une base de données répertoriant les gènes cibles de c-Myc (<http://www.myccancergene.org/>) (Zeller et al., 2003).

Plus récemment, les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont permis d'identifier les véritables cibles directes de c-Myc. Cette technique rend compte que la liaison de c-Myc à l'ADN est hautement dépendante de la structure chromatinienne et de ses modifications, telle que la méthylation des histones (Guccione et al., 2006). Les techniques de ChIP peuvent être associées à une analyse à grande échelle des fragments. Cette analyse globale peut être basée sur l'hybridation des fragments précipités sur une puce (ChIP on chip), ou le séquençage d'une courte séquence du fragment d'ADN immunoprécipité (ChIP-SAGE et ChIP Seq) ou de leur extrémité 5' et 3' (ChIP-PET). En 2006, une étude utilisant la technique de ChIP-PET a permis d'identifier le réseau de gènes cibles de c-Myc dans les cellules B, en utilisant une lignée inductible pour c-Myc (Zeller et al., 2006).

Ces techniques mises en œuvre pour identifier les cibles de Myc ont révélés que cette protéine est un régulateur transcriptionnel clef. Contrairement aux autres facteurs de transcription, c-Myc peut se lier sur 10 à 15 % du génome et peut réguler à la fois des gènes codant des protéines (telles que des enzymes du métabolisme comme la LDH - *Lactate Dehydrogenase* - ou l'ODC - *Ornithine Decarboxylase* -, des protéines du cycle cellulaire comme Cycline D2, ou des protéines de la biogénèse des ribosomes comme BN51) ou des gènes codant des ARN non-codant (Patel et al., 2004). Cependant, seulement une fraction de gènes semble être régulée par c-Myc indépendamment du type cellulaire ou de l'espèce (gènes de la prolifération et du métabolisme qui sont activés et

gènes impliqués dans la communication et les interactions cellulaires qui sont réprimés). Des divergences peuvent être constatées entre les différentes études voulant définir les cibles de c-Myc, différences pouvant être dues aux modèles d'étude ou encore aux variations statistiques dans l'analyse des résultats des données des puces à ADN (Dang et al., 2006).

1.3.2. Fonction des gènes cibles de c-Myc

En réponse aux signaux du microenvironnement cellulaire, c-Myc peut réguler un large spectre d'activités biologiques distinctes, telles que le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la synthèse protéique, le blocage de la différenciation, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, le métabolisme, l'instabilité génomique, l'angiogénèse ou encore les microARN. C-Myc est clairement une protéine multifonctionnelle, et de ce fait un puissant oncogène à la vue des nombreuses voies qu'il contrôle, certaines aboutissant au processus néoplasique lorsqu'elles sont dérégulées.

Nous présenterons quelques grandes fonctions régulées par c-Myc ; de nombreuses revues sur le sujet permettront au lecteur de compléter cette rubrique (Boxer and Dang, 2001; Oster et al., 2002; Dang et al., 2006; Meyer and Penn, 2008).

1.3.2.1. Cycle cellulaire et prolifération

L'une des fonctions de c-Myc est de promouvoir la progression dans le cycle cellulaire ainsi que la prolifération. A chaque changement de phase dans le cycle cellulaire, il existe des points de contrôle (*checkpoint*). Les protéines impliquées dans le contrôle des différents passages du cycle cellulaire appartiennent à la famille des CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) dont l'activation est dépendante d'une phosphorylation réversible. La **Figure 6** rappelle les différentes étapes du cycle cellulaire et les complexes cycline-CDK associés.

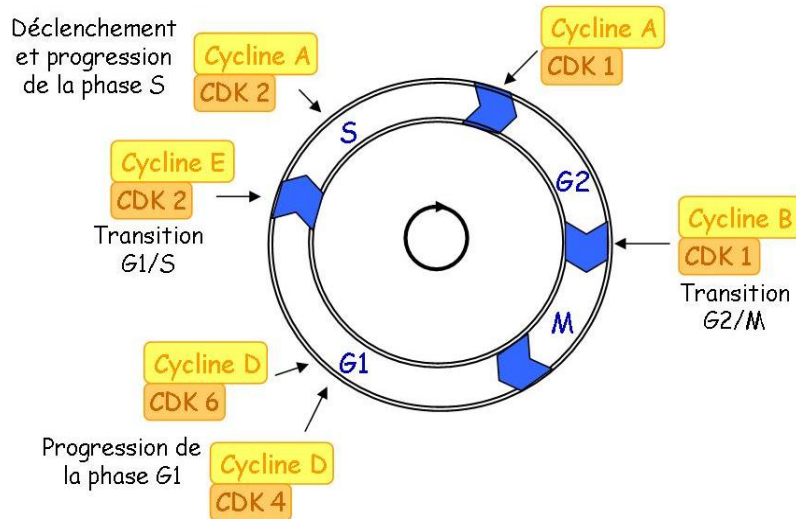


Figure 6 : Le cycle cellulaire.

Rappel des différentes phases du cycle cellulaire et des complexes cycline-CDK associés pour le passage des points de contrôle et la progression dans le cycle.

Le gène *c-myc* est rapidement induit suite à une stimulation mitogénique et permet le passage de la cellule de la phase G0/G1 du cycle cellulaire à la phase S en régulant l'expression de nombreux gènes. Son expression aboutit d'une part à l'activation directe ou indirecte des complexes cycline/CDK ; et d'autre part, à la diminution de l'expression des gènes impliqués dans les points de contrôle, tels que *gas1*, *gadd45*, *gadd153* et des inhibiteurs des CDK (CDKI - *CDK-Inhibitor*) : $p15^{\text{INK4b}}$, $p21^{\text{Cip1}}$ et $p27^{\text{Kip1}}$ (cf. **Figure 7**) (Dang, 1999).

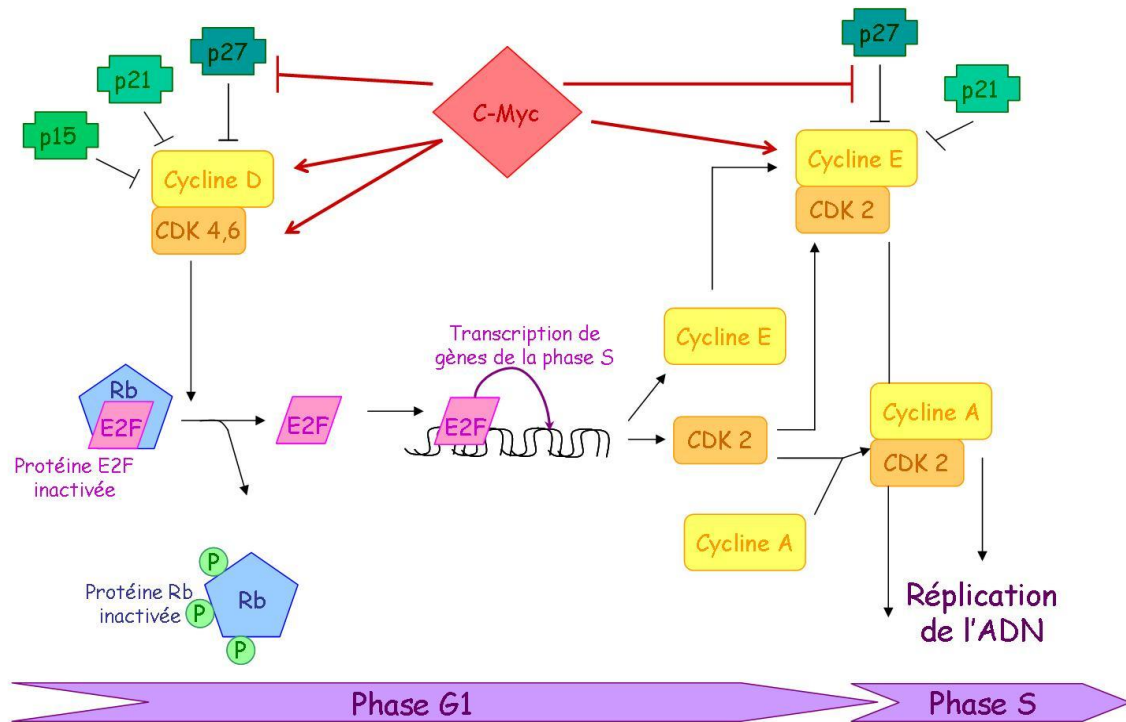


Figure 7 : Le contrôle de la progression en G1 et du passage en G1/S par c-Myc.

C-Myc permet l'activation de la transcription des gènes cyclines D et E et l'activation de la phosphorylation de pRb aboutissant à la libération du facteur de transcription E2F. C-Myc réprime l'activité des inhibiteurs des CDK et favorise la dégradation de p27 par le protéasome.

Il est important de noter que la progression des cellules eucaryotes de la phase G1 du cycle à la phase S est contrôlée par les complexes cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2. Les hétérodimères Myc-Max activent leurs gènes cibles *CCND2* (qui code pour la cycline D2) et *CDK4*. L'activation du complexe cycline D-CDK4 engendre la phosphorylation de Rb, qui libère ainsi le facteur E2F, facteur permettant la transcription du gène de la cycline E. En parallèle, c-Myc induirait la séquestration de la CDKI p27^{Kip1} (Bouchard et al., 1999). En conséquence, p27^{Kip1} n'est ainsi plus disponible pour inhiber l'activité du complexe cycline E-CDK2 qui va phosphoryler Rb libérant le facteur de transcription E2F. E2F prépare alors la cellule à son entrée dans la phase S en activant la transcription de la cycline suivante : la cycline A. De plus, il a été montré que c-Myc pouvait induire directement la transcription du gène codant la cycline E, et indirectement la dégradation de p27^{Kip1} par le complexe ubiquitine-protéasome via l'augmentation de l'expression du gène *CUL1* (Perez-Roger et al., 1997; O'Hagan et al., 2000). Enfin, des études ont mis en évidence que c-Myc réprime la transcription des gènes codant des inhibiteurs des CDK (p15 et p21) en interagissant avec le facteur transcriptionnel Miz-1 (Staller et al., 2001).

1.3.2.2. Croissance cellulaire et synthèse protéique

C-Myc a la capacité de promouvoir le potentiel prolifératif d'une cellule en régulant la croissance cellulaire. La croissance cellulaire est définie par une augmentation de la masse ou de la taille d'une cellule, ce qui est un pré-requis à la division cellulaire. Cette voie est distincte de la capacité de c-Myc à conduire la cellule dans le cycle cellulaire, puisqu'il a été prouvé que l'activation par c-Myc du complexe cycline E-cdk2, de la transcription d'E2F et de la croissance cellulaire sont trois éléments génétiquement distincts (Beier et al., 2000). L'étude de l'orthologue de *c-myc* chez la drosophile (*dmyc*) a montré qu'une diminution de l'expression de dMyc entraîne une diminution de la taille des cellules, alors que sa surexpression aboutit à une augmentation de la taille des cellules, celle-ci devenant même plus importante que la normale (Johnston et al., 1999). Cette propriété de c-Myc à promouvoir la croissance cellulaire a aussi été démontrée pour les cellules de mammifères. Des cellules B de souris exprimant le transgène *Eμ-myc* présentent une augmentation de la synthèse protéique accompagnée d'une augmentation de leur taille et ce, à tous les stades de leur développement (Iritani and Eisenman, 1999). En parallèle de cette étude, l'équipe de Bornkamm a montré que le contrôle de la croissance cellulaire par c-Myc est indépendant de sa capacité à promouvoir la division cellulaire. En effet, le traitement de la lignée B P493-6, exprimant le gène *c-myc* sous le contrôle de la tétracycline (c-Myc étant exprimée en absence de tétracycline), et étant dépendante de la présence de sérum dans le milieu pour la prolifération, avec de la roscovitine (un inhibiteur de cdk2) bloque la phosphorylation de Rb et l'entrée dans le cycle cellulaire, en présence de sérum, alors que la taille des cellules n'est pas affectée, comparativement aux témoins non traités (Schuhmacher et al., 1999). En 2002, l'équipe d'Eisenmann a souligné le fait que l'antagoniste de c-Myc (Mad1) peut inhiber la maturation et la croissance des lymphocytes T (Iritani et al., 2002). Cependant, en 2001, contrairement aux travaux précédents, il a été montré qu'une diminution de l'expression de *c-myc* sur une lignée de souris transgénique, n'affecte pas la croissance cellulaire mais la masse corporelle de la souris en raison d'une hypoplasie multi-organes (Trumpp et al., 2001).

Les mécanismes précis par lesquels c-Myc régule la croissance cellulaire ne sont pas encore élucidés. Cependant, plusieurs gènes candidats sont proposés ; gènes régulant la synthèse protéique et/ou le métabolisme de la cellule. C-Myc intervient notamment dans la régulation de la transcription des ARN polymérase I et III, impliquées dans la biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique, en se liant au facteur de transcription TFIIIB, spécifique de l'ARN polIII (Gomez-Roman et al., 2003).

1.3.2.3. Blocage de la différenciation

Dans de nombreux types cellulaires, une diminution de l'expression de c-Myc accompagne le processus de différenciation terminale et la sortie définitive des cellules du cycle cellulaire. C-Myc est exprimée dans les cellules proliférantes, alors que les niveaux d'ARNm et protéiques sont quasi-indéetectables dans les cellules différenciées (Gonda and Metcalf, 1984; Larsson et al., 1994). Ces études indiquent que la régulation négative de c-Myc est un élément essentiel pour que la cellule se différencie et cette observation est particulièrement vraie pour les cellules de la lignée myéloïde (Hoffman-Liebermann and Liebermann, 1991). Ainsi, le traitement d'une lignée de cellules myéloïdes avec un oligonucléotide anti-sens de c-Myc (inhibant son expression), induit leur différenciation (Holt et al., 1988).

Cependant, le rôle de c-Myc dans l'inhibition de la différenciation est controversé, puisqu'en 1997, Gandarillas et Watt ont observé que c-Myc peut induire, *in vitro*, la différenciation de cellules souches de kératinocytes (Gandarillas and Watt, 1997). Plus récemment, des études ont suggéré que c-Myc a un rôle dans l'induction de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et épidermiques, en régulant l'expression de molécules d'adhésion (Murphy et al., 2005). En 2007, l'équipe d'Iritani, qui étudiait l'oncogène c-Myc lors du processus de différenciation des lymphocytes B, a montré que le rôle de c-Myc dépend du statut de différenciation de la cellule : l'expression de c-Myc dans les cellules souches et les progéniteurs permet la différenciation, alors que son expression dans les cellules matures inhibe la différenciation terminale (Habib et al., 2007).

1.3.2.4. Adhésion cellulaire et cytosquelette

La surexpression de c-Myc entraîne la régulation négative de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire. Par exemple, une étude du transcriptome après activation de c-Myc sur des kératinocytes de souris transgéniques a permis d'identifier 218 gènes cibles. Parmi les gènes régulés positivement, on trouve ceux impliqués dans la synthèse de protéine ou dans la prolifération, alors que 30% des gènes sous-exprimés sont impliqués dans l'adhésion cellulaire et 11% codent pour des protéines relatives au cytosquelette (Frye et al., 2003). La croissance dépendante de l'ancrage des cellules normales est régulée par des molécules d'adhésion dont l'expression est diminuée lors du cycle cellulaire permettant la mitose et la cytokinèse. En 1998, l'équipe de Dang a montré que c-Myc augmente la croissance indépendante de l'ancrage d'une lignée de cancer du poumon humaine et réprime l'expression de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$. La reconstitution de l'expression de l'intégrine par la transfection de la sous-unité $\alpha 3$ est suffisante pour supprimer la croissance indépendante de

l'ancrage médiée par c-Myc et permettre l'agrégation des cellules (Barr et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que c-Myc joue un rôle dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques (CSH). La suppression de l'activité de c-Myc dans les progéniteurs de la moelle osseuse entraîne une cytopénie sévère ainsi qu'une accumulation des cellules souches hématopoïétiques *in situ*. La diminution de la différenciation des CSH déficientes pour c-Myc est associée à leur localisation dans la moelle osseuse et corrèle avec la surexpression de la N-cadhérine, suggérant que le relargage des CSH hors de la niche des cellules souches nécessite l'expression de c-Myc. A l'inverse, la surexpression de c-Myc dans les CSH réprime l'expression de la N-cadhérine, et d'autres intégrines, ce qui aboutit à la perte de l'auto-renouvellement des cellules. Ainsi, c-Myc régulerait l'interaction entre les CSH et leur niche (Wilson et al., 2004).

1.3.2.5. Métabolisme

De nombreuses voies du métabolisme cellulaire sont également régulées par c-Myc. Plusieurs enzymes clefs du métabolisme du glucose ont été recensées comme gène cibles dans différentes études concernant les cibles de c-Myc, comme l'enolase A, l'hexokinase II, la lactate déshydrogénase A ou encore la phosphofructokinase. La surexpression de c-Myc régule de façon positive des gènes impliqués dans la biogénèse de la mitochondrie. Des gènes impliqués dans le métabolisme du fer sont également des cibles de c-Myc, ainsi que les gènes codant la carbamoyl phosphate synthase, l'aspartate transcarbamylase, ou l'ornithine décarboxylase, enzymes nécessaires à la synthèse nucléotidique (Dang et al., 2006).

1.3.2.6. Instabilité génomique

Des travaux conduits sur des cellules où c-Myc est dérégulée ont montré que des amplifications de gènes se produisent à haute fréquence. Ainsi, une surexpression de c-Myc promeut une instabilité chromosomique (Felsher and Bishop, 1999b). Cependant, étant donné que l'instabilité génétique est relativement dépendante du contexte, des auteurs se sont posé la question du véritable rôle de c-Myc (Dang et al., 2005a). Plusieurs mécanismes ont été alors proposés : une augmentation des niveaux d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Dang et al., 2005a), une altération de la structure chromosomique (Prochownik and Li, 2007) ou encore une induction de dommages de l'ADN (Adachi et al., 2001).

1.3.2.7. Angiogénèse

Dans les années 2000, il a été suggéré un lien entre l'angiogénèse et la dérégulation de c-Myc. En effet, l'activation de c-Myc (via *Ras*) permet sa phosphorylation et c-Myc phosphorylée réprime l'expression de la thrombospondine-1, un inhibiteur de l'angiogénèse (Watnick et al., 2003). Récemment, des études ont montré que c-Myc induit la production et la sécrétion de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dans le myélome multiple (Podar et al., 2006; Zhang et al., 2009). Cependant, l'équipe de Dang a montré que, concernant les cellules du cancer du poumon, c-Myc diminue la formation de tumeurs *in vivo* en régulant négativement l'expression du VEGF (Barr et al., 2000). A la vue de ces observations contradictoires, le rôle de c-Myc dans l'angiogénèse serait en partie dicté par le microenvironnement cellulaire. D'autres investigations sont nécessaires pour comprendre sa véritable implication.

1.3.2.8. MicroARN

La plus récente classe de gènes cibles de c-Myc identifiée sont les microARN, petites molécules qui régulent la stabilité ou l'efficacité traductionnelle des ARNm cibles. Les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme de longs précurseurs appelés pri-miARN puis sont clivés dans le noyau pour former des pré-miARN, d'environ 70 nucléotides, repliés en boucle par complémentarité de séquence. Les pré-miARN sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils sont clivés pour donner des mi-ARN, de 21 à 24 nucléotides. L'un des brins du mi-ARN mature est incorporé dans un complexe multiprotéique, le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) qui réprime de façon séquence-spécifique la stabilité ou la traduction de l'ARNm cible. Chez l'homme, plusieurs gènes de mi-ARN ont été positionnés à proximité de loci cartographiés, connus pour agir en tant que suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes (Croce and Calin, 2005).

Afin de savoir si les mi-ARN sont régulés par c-Myc, le profil d'expression des mi-ARN a été réalisé sur une lignée de cellules B dont l'expression de c-Myc est régulable par la tétracycline (la lignée P493-6). Il a été observé que c-Myc active un cluster de six mi-ARN localisés sur le chromosome 13, appelé le cluster mir-17. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé que c-Myc se lie sur une séquence *E-box* non canonique, conservée, en amont du cluster mir-17. Il est intéressant de noter que deux mi-ARN du cluster mir-17 régulent négativement l'expression du facteur de transcription E2F, une des cibles de c-Myc qui permet la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, c-Myc peut activer la transcription d'un gène cible et, simultanément,

en inhiber sa traduction, suggérant une régulation très fine du contrôle de la prolifération par c-Myc (O'Donnell et al., 2005).

1.3.2.9. Apoptose

Au début des années 90, plusieurs études ont révélé que l'expression ectopique de c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Shi et al., 1992). C-Myc peut soit induire, soit sensibiliser les cellules à l'apoptose. L'étude de la privation en Il-3 de la lignée myéloïde murine 32Dcl3 (dépendante de l'Il3 pour sa croissance) a montré qu'en l'absence de cette cytokine, l'expression de c-Myc est diminuée, avec pour conséquence l'accumulation des cellules dans la phase G0/G1 du cycle et éventuellement la mort cellulaire. Si l'expression de c-Myc est forcée, toujours en l'absence d'Il-3, le processus d'entrée en apoptose est accéléré (Askew et al., 1991). Le rôle de c-Myc dans le processus d'apoptose a été confirmé par l'étude de lymphocytes B primaires déficients pour c-Myc, observés comme résistants à différents stimuli apoptotiques, tels que l'induction de l'apoptose par la staurosporine ou le pontage du récepteur CD95 (De Alboran et al., 2004). Les mécanismes moléculaires de l'induction de l'apoptose par c-Myc sont encore très peu étudiés et restent partiellement compris. Il apparaît en effet que les différentes voies menant à l'apoptose peuvent être régulées par c-Myc : les voies dépendantes ou indépendantes de l'antioncogène p53, la voie mitochondriale (impliquant les protéines anti-apoptotique, telle que Bcl-2 ou pro-apoptotique, telle que Bax) ou la voie des récepteurs de mort (impliquant les récepteurs de la famille du TNF, tel que CD95) (cf. **Figure 8**) (Hoffman and Liebermann, 2008).

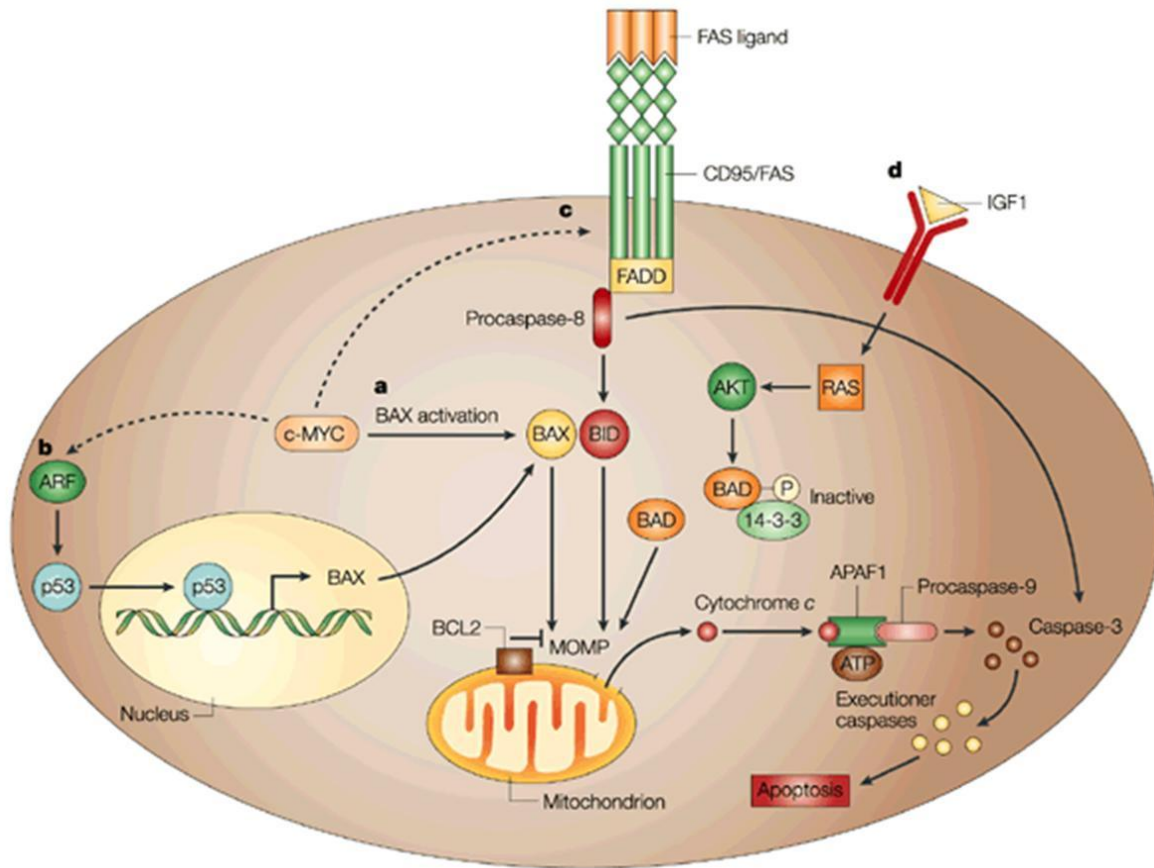


Figure 8 : Voies de signalisation impliquant c-Myc dans l'apoptose.

a) : C-Myc active la protéine Bax aboutissant à la création de pores perméabilisant la membrane mitochondriale (MOMP – mitochondrial-outer-membran permeabilization) et au relargage de cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c va s'associer avec la protéine Apaf-1 et la procaspase-9 pour former l'apoptosome. La procaspase-9 est clivée engendrant l'activation des caspases effectrices et donc l'apoptose.

b) : C-Myc peut également induire le relargage du cytochrome c en activant p53, via ARF, ce qui aboutit à la transcription du gène Bax.

c) : L'engagement du récepteur Fas permet son association avec la protéine adaptatrice FADD (FAS-associated death domain), entraînant le recrutement de la procaspase-8, puis son auto-activation, qui va ainsi cliver et activer les caspases effectrices. La caspase-8 peut également activer la protéine Bid qui va perméabiliser la membrane mitochondriale.

d) : Les signaux de survie comme la signalisation via le récepteur IGF1 (Insulin Growth Factor 1) qui active Ras puis AKT permettant la phosphorylation de Bad, ainsi séquestré par la protéine 14-3-3 dans le cytoplasme, ou le maintien de Bcl-2 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie empêchant le relargage du cytochrome c, sont deux mécanismes réprimés par c-Myc.

(Pelengaris et al., 2002a).

✓ **C-Myc et p53** : C-Myc influence p53 quant à sa fonction d'arrêt de la croissance cellulaire ou d'induction de l'apoptose. La protéine p53 est exprimée à de faibles niveaux dans les cellules et son expression augmente en réponse au stress. La boucle de régulation ARF-Mdm2-p53 contrôle le niveau de la protéine p53. Mdm2 est un régulateur négatif de p53, entraînant sa dégradation par le protéasome et ARF inhibe Mdm2. L'activation de c-Myc, par le facteur de transcription FoxO, entraîne l'augmentation de l'expression de ARF, aboutissant à l'augmentation de la protéine p53.

(Bouchard et al., 2007). La protéine kinase ATM (régulateur majeur de la réponse cellulaire aux cassures double-brin de l'ADN), active p53 par phosphorylation en Ser¹⁵ notamment. Il a été montré que l'augmentation de la prolifération induite par la surexpression de c-Myc entraîne, *in vivo*, des dommages de l'ADN, et donc l'activation de la voie ATM (aboutissant à l'activation de p53) et promeut ainsi l'apoptose (Pusapati et al., 2006). p53 induit l'expression des gènes *p21^{Cip1}* et *gadd45* (impliqués dans l'arrêt de la croissance), alors que c-Myc les réprime (cf. 1.3.2.1). En inhibant *p21^{Cip1}*, c-Myc entraîne une réponse de p53 en faveur de la mort cellulaire (Vousden, 2002). Mais clairement, ce sont les niveaux d'expression de p53 et de c-Myc qui vont déterminer si *gadd45* et *p21* sont induits ou réprimés et par conséquent si la cellule va entrer en apoptose ou stopper sa croissance.

✓ C-Myc et la voie mitochondriale : Plusieurs études ont montré que c-Myc amplifie la voie mitochondriale apoptotique en activant les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak ou Bim) ou en réprimant les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L). Dans un modèle de souris transgéniques *Eμ-myc*, l'activation de c-Myc diminue les niveaux d'ARN et de protéine Bcl-X_L dans les cultures primaires lymphoïdes et inhibe l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L dans les cellules B précancéreuses. (Eischen et al., 2001). La surexpression de c-Myc régule de façon positive les niveaux d'ARN et l'expression de la protéine Bax, le gène de *Bax* contenant dans son promoteur des séquences *E-Box* permettant la fixation des hétérodimères Myc-Max ; de plus, *Bax* est un gène cible de p53 (Mitchell et al., 2000). Dans les cellules B, la protéine Bim est induite par c-Myc (Egle et al., 2004). Enfin, dans un modèle de fibroblastes de rat, il a été observé que c-Myc induit le relargage du cytochrome c, en augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale dépendante de Bid, qui interagit alors avec la protéine cytoplasmique Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), aboutissant à l'activation des caspases (Iaccarino et al., 2003).

✓ C-Myc et les récepteurs de mort : La surexpression de c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose induite par les ligands des récepteurs de mort : CD95L et TRAIL. C-Myc réprime la transcription de *c-FLIP* (inhibiteur de la caspase 8), aboutissant donc à une augmentation de l'activation de la caspase 8 (Ricci et al., 2004). Dans le cas d'une signalisation impliquant TRAIL, il a été montré que c-Myc contrôle une boucle d'amplification des signaux caspase 8-Bid (Nieminen et al., 2007). De façon générale, c-Myc réprime des voies de survie pouvant être associées aux récepteurs de mort et à l'activation du DISC (complexe de signalisation induisant la mort) entraînant ainsi l'apoptose. Ainsi, c-Myc inhibe l'activation de NF-κB, facteur de transcription qui protège de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Kleefstrom et al., 1997).

1.4. C-Myc et la tumorigenèse

L'oncogène *c-myc* joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire en activant ou réprimant de nombreux gènes. Ainsi, ce paragraphe a pour but de montrer comment ce proto-oncogène participe à la transformation cellulaire et donc aux processus de tumorigenèse.

1.4.1. Mécanismes de la dérégulation de l'expression de c-Myc

Plusieurs mécanismes aboutissant à la dérégulation de *c-Myc* ont été observés. Ces mécanismes impliquent des modifications du locus du gène comme la mutagenèse par insertion, la translocation ou l'amplification du gène. Mais l'oncoprotéine peut également être dérégulée par différents mécanismes ciblant son expression, son activité ou stabilisant l'ARNm ou la protéine, de façon directe ou indirecte.

1.4.1.1. A l'échelle du gène

✓ La mutagenèse par insertion : L'insertion de séquences de virus dans le génome hôte peut activer de façon inappropriée un oncogène adjacent. Dans le cas de la leucémie induite par le virus de la myélocytomatose aviaire, il a été montré qu'un gène chimérique *v-gag-myc* est généré. L'analyse de tumeurs induites par le virus de la leucose aviaire a montré l'existence d'ARN chimères cellulaire-viral (Neel et al., 1981). La même équipe a d'ailleurs analysé l'ADN et l'ARN issus de lymphomes induits par ce même virus. Il s'avère que la transcription du gène est initiée à partir du promoteur du virus, induisant sa surexpression et aboutissant à la transformation néoplasique (Hayward et al., 1981). *C-myc* a été le premier oncogène cellulaire pour lequel son activation par insertion d'un promoteur rétroviral a été démontrée. Par la suite, des séquences pro-virales adjacentes au gène *c-myc* ont été mises en évidence dans des lymphomes induits par le virus de la leucémie murine chez des souris et des rats (Steffen, 1984). Ces différents résultats ont permis de conclure que la transformation néoplasique peut résulter de l'activation d'un gène cellulaire non muté. Depuis ces travaux, la mutagenèse par insertion a été largement utilisée comme outil pour découvrir de nouveaux oncogènes cellulaires (Peters, 1990).

✓ La translocation chromosomique : En 1982, l'analyse de lymphomes de Burkitt a permis de constater qu'une région du chromosome 8 est transloquée au niveau du chromosome 14, et plus particulièrement au niveau du locus des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (Erikson et al., 1982). Les auteurs avaient suggéré à l'époque que les gènes des régions variables des chaînes lourdes des immunoglobulines pouvaient causer l'activation de cette portion de chromosome 8

anormalement présente sur le chromosome 14. Trois mois plus tard, l'équipe de Dalla-Favera a localisé le gène *c-myc* sur le chromosome 8, au locus q24, région effectivement transloquée sur le chromosome 14 (et plus rarement sur les chromosomes 2 et 22) dans les lymphomes de Burkitt (Dalla-Favera et al., 1982a). L'idée que la juxtaposition de *c-myc* au niveau du loci des gènes des immunoglobulines soit responsable de l'apparition de lymphomes a été émise. La translocation de *c-myc* est associée à différentes pathologies, particulièrement à des hémopathies malignes (cf **Tableau 1**). Nous reviendrons plus en détail sur la translocation t (8 ; 14) dans le paragraphe traitant du lymphome de Burkitt (cf. 2.2.4).

Translocations	Gènes	Pathologies
t (8 ; 14) (q24 ; q32)	<i>c-myc</i> / IgH	Lymphome de Burkitt
t (2 ; 8) (p12 ; q24)	Igκ / <i>c-myc</i>	Lymphome de Burkitt
t (8 ; 22) (q24 ; q11)	<i>c-myc</i> / Igλ	Lymphome de Burkitt
t (8 ; 14) (q24 ; q32)	<i>c-myc</i> / IgH	Lymphome diffus à grandes cellules
t (8 ; 14) (q24 ; q11)	<i>c-myc</i> / TCR α, β	Leucémie lymphoblastique aigüe
t (8 ; 14) (q24 ; q32)	<i>c-myc</i> / IgH	Myélome multiple
t (2 ; 8) (p12 ; q24)	Igκ / <i>c-myc</i>	Myélome multiple
t (8 ; 22) (q24 ; q11)	<i>c-myc</i> / Igλ	Myélome multiple

Tableau 1 : Translocations impliquant *c-myc* et pathologies associées.

(Boxer and Dang, 2001).

✓ L'amplification de gènes : Toujours au début des années 80, une autre anomalie génétique impliquant *c-myc* dans la cancérogenèse a été mise en évidence dans la lignée HL60. Cette dernière présente en effet plusieurs copies du gène *c-myc* (Dalla-Favera et al., 1982b). L'amplification de l'homologue de c-Myc, N-Myc, en théorie exprimé seulement dans les cellules en développement a été découvert dans plusieurs échantillons de tumeurs et a été associé à un mauvais pronostic (Brodeur et al., 1984). Le troisième membre de la famille Myc, L-Myc est également amplifié dans le carcinome de l'ovaire (Wu et al., 2003). A l'inverse des translocations chromosomiques, impliquées dans les cancers hématopoïétiques, le phénomène d'amplification est plus fréquent dans les tumeurs solides.

1.4.1.2. A l'échelle transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Le promoteur du gène de *c-myc* est un point de convergence de nombreuses cascades de signalisation. Ainsi, la dérégulation de la transcription du gène peut être sous la dépendance de facteurs agissant directement ou indirectement sur le promoteur (par exemple, les facteurs E2Fs, les voies des MAPK et de la PI3K), aboutissant à la prolifération cellulaire et à la transformation (Wierstra and Alves, 2008). Dans le cas du lymphome de Burkitt, alors que *c-myc* est transloqué au locus des gènes des immunoglobulines, l'utilisation du promoteur (changement d'utilisation du promoteur de P2 à P1) et l'élongation transcriptionnelle sont modifiées (Taub et al., 1982; Taub et al., 1984; Denny et al., 1985; Bentley and Groudine, 1986; Eick and Bornkamm, 1986).

La plupart des variations observées dans les niveaux des transcrits de *c-myc* peuvent être imputables à une régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, deux mécanismes de dégradation des ARNm ont été mis en évidence. Le premier est indépendant de la transcription et implique la queue poly(A) qui est régulée par une région riche en AU dans la région 3' non traduite (Brewer and Ross, 1988). Le second est dépendant de la transcription et est régulé par une région de l'ARNm correspondant au domaine carboxy-terminal de la protéine (Bernstein et al., 1992). Ces deux mécanismes pourraient être dérégulés dans les cellules transformées puisque de hauts niveaux d'ARNm de *c-myc* sont observés. De plus, il a été montré dans des modèles de souris transgéniques que la dérégulation de l'expression des ARNm de *c-myc* peut conduire au développement de cancers (Adams et al., 1985).

1.4.1.3. A l'échelle de la protéine

La protéine c-Myc présente plusieurs résidus thréonine et sérine pouvant être phosphorylés (cf. 1.1.3.2). Les deux résidus apparaissant comme les plus souvent phosphorylés (Thr⁵⁸ et Ser⁶²) jouent un rôle dans la transformation en régulant l'activité et la stabilité de la protéine (Hann, 2006). Des stimuli prolifératifs activent des kinases phosphorylant Ser⁶² et augmentent la stabilité de c-Myc. De plus, la phosphorylation de Ser⁶² permet en aval la phosphorylation de Thr⁵⁸ permettant ainsi à la protéine suppresseur de tumeur FBW7 de recruter le complexe SCF^{FBW7} dirigeant c-Myc vers l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome (cf. 1.1.3.2). Des mutations sur des points chauds du gène *FBW7* ou sur l'arginine de la protéine FBW7 ne lui permet plus de se lier à c-Myc et de promouvoir ainsi sa dégradation (Sears, 2004; Welcker and Clurman, 2008). D'autres mécanismes régulent la protéine c-Myc, telle la forme tronquée de la protéine (c-Myc S pour *Short*)

qui joue le rôle de dominant négatif (Spotts et al., 1997) et les protéines ITAFs, récemment mises en évidence, qui régulent l'expression de c-Myc (Cobbold et al., 2008).

Même s'il est clair que de nombreux mécanismes post-traductionnels régulent c-Myc, les conséquences de ces modifications dans leur ensemble sont encore mal comprises (Hann, 2006). De fait, les mécanismes contrôlant l'expression, la dégradation ou la stabilité de la protéine sont des pistes qui restent encore à explorer afin de comprendre le rôle de c-Myc dans la transformation.

1.4.2. Comment c-Myc transforme la cellule ?

1.4.2.1. De la cellule normale à la cellule maligne

En 2000, Hanahan et Weinberg ont suggéré que la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale requiert six propriétés : une autosuffisance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, la capacité à échapper aux signaux apoptotiques, un potentiel réplicatif illimité, la capacité à stimuler l'angiogénèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (Hanahan and Weinberg, 2000). Reprenons ces six propriétés une à une afin de constater à quels niveaux c-Myc pourrait intervenir dans la genèse d'une cellule cancéreuse :

✓ L'autosuffisance vis-à-vis des signaux de prolifération : Les cellules normales ont besoin de signaux leur permettant de passer d'un état quiescent à un état prolifératif, signaux qui leur sont transmis via la liaison de molécules de signalisation à leurs récepteurs transmembranaires. De nombreuses cellules cancéreuses acquièrent la capacité à synthétiser elles-mêmes les facteurs de croissance auxquels elles répondent, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive aboutissant à leurs propres stimulations comme par exemple les cellules de glioblastomes qui synthétisent le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) ou les cellules de sarcome qui produisent le TGF α (*Tumor Growth Factor α*). De plus, les voies de signalisation activées par ces signaux sont altérées dans de nombreux cas de tumeurs, comme la cascade SOS-Ras-Raf-MAPK. (Hanahan and Weinberg, 2000). Or, le promoteur de *c-myc* est la cible de nombreux signaux prolifératifs, entre autre de la voie des MAPK (Wierstra and Alves, 2008). Puis, à son tour, la protéine régule la progression dans le cycle cellulaire (cf. 1.3.2.1). Ainsi, une dérégulation de son expression, telle sa surexpression, permet à la cellule de proliférer de façon autonome.

✓ L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération : Dans un tissu normal, de nombreux signaux antiprolifératifs permettent un maintien de l'homéostasie tissulaire. Les voies permettant à une cellule de répondre aux signaux antiprolifératifs sont associés au cycle cellulaire et

impliquent notamment la protéine pRb. Lorsqu'elle est hypophosphorylée, cette protéine bloque la prolifération en séquestrant le facteur E2F. Le facteur soluble TGF β (*Tumor Growth Factor β*) agit entre autre en empêchant la phosphorylation qui inactive pRb et ainsi bloque la progression en G1. De plus, le TG β réprime l'expression de c-Myc, qui participe également à la progression de la cellule dans le cycle cellulaire. Dans différents cas de tumeurs, comme le cancer du sein par exemple, les cellules deviennent insensibles au TGF β , empêchant ainsi ses actions antiprolifératives. En conséquence, la dérégulation de l'expression de c-Myc influence la cellule, lui permettant d'entrer dans un état de prolifération continue (Hanahan and Weinberg, 2000; Francis et al., 2009).

✓ L'échappement aux signaux apoptotiques : L'observation de modèles animaux ou de biopsies de tumeurs ont révélé que les cellules cancéreuses étaient résistantes aux signaux apoptotiques. Par exemple, la voie p53 est mutée dans 50% des tumeurs. Or, c-Myc peut induire ou sensibiliser les cellules à l'apoptose et son implication intervient à plusieurs niveaux, en activant entre autre la voie p53. (cf. 1.3.2.9). Dans le cas où cette dernière n'est plus fonctionnelle suite à des mutations sur le gène *p53*, c-Myc n'induit plus l'apoptose. Dans le cas des lymphomes de Burkitt où le gène *p53* n'est pas muté dans 50 % des tumeurs, c-Myc induit cependant une intense prolifération des cellules, malgré l'activation potentielle de p53, car c-Myc n'active pas la protéine Bim, inducteur de l'apoptose via l'inhibition des protéines de la famille Bcl-2 (Dang et al., 2005b; Hemann et al., 2005). Ainsi, la dérégulation de l'expression de c-Myc est un évènement nécessitant que la cellule cancéreuse échappe à l'induction de l'apoptose. Sa dérégulation altère la balance d'expression des molécules anti-apoptotiques vs les molécules pro-apoptotiques, et l'inactivation d'une des voies apoptotiques en aval de c-Myc aboutit à la prolifération et initie la lymphomagenèse (Meyer et al., 2006).

✓ Un potentiel répliatif illimité : Les trois propriétés présentées précédemment permettent à une cellule de proliférer seule. Cependant, une cellule est supposée posséder un potentiel répliatif limité. En 1997, Hayflick montra qu'après un certain nombre de doublements, la cellule entre en sénescence, conséquence du raccourcissement de ses télomères. Dans les cellules cancéreuses, la télomérase, enzyme catalysant la synthèse de séquences composant ces télomères est toujours activée. La cellule ayant ses télomères synthétisés indéfiniment ne rentre plus en sénescence (Hayflick, 1997). Or, c-Myc induit la transcription de la sous-unité catalytique de la télomérase ; une surexpression de c-Myc peut entraîner l'immortalisation de la cellule, via l'activation continue de la télomérase (Wang et al., 1998).

✓ La capacité à stimuler l'angiogénèse : La néovascularisation est un pré-requis à l'expansion clonale associée à la formation de tumeurs macroscopiques (Hanahan and Weinberg, 2000). Dans le paragraphe 1.3.2.7, nous avons vu que c-Myc réprime l'expression de la thrombospondine-1 (inhibiteur de l'angiogénèse), ainsi une surexpression de c-Myc promeut la néovascularisation en réprimant cet inhibiteur. Le rôle de c-Myc dans l'angiogénèse est controversé mais il reste néanmoins associé à ce processus.

✓ L'acquisition d'un pouvoir invasif : Tôt ou tard, des cellules de la masse tumorale initiale métastasent : elles "s'échappent" et envahissent les tissus adjacents afin de former une nouvelle tumeur, on parle de métastase. De nombreuses protéines d'adhésion, intégrines ou sélectines, ainsi que les protéines du cytosquelette sont impliquées dans les interactions cellules à cellules. Un changement de leur expression est observé dans les cellules cancéreuses métastatiques. Comme nous l'avons vu précédemment (cf. 1.3.2.4), c-Myc diminue l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et de protéines relatives au cytosquelette. Ainsi, une dérégulation de son expression peut participer à l'activité invasive de la tumeur.

Ainsi, *c-myc* peut être impliqué dans quatre à cinq des six niveaux définissant une cellule cancéreuse (l'échappement aux signaux apoptotiques requérant un second évènement et son rôle dans l'angiogénèse étant controversé), faisant de ce gène un puissant oncogène. Cependant, la cancérisation est un processus multi-étapes et multifactoriels, une seule cause ou un seul dérèglement n'aboutissant pas à la tumorigenèse.

1.4.2.2. La coopération avec d'autres évènements oncogéniques

Il a été mis en lumière la collaboration de c-Myc avec d'autres oncogènes, facilitant l'acquisition des propriétés citées auparavant. En 1983, l'équipe de Weinberg montra la nécessité de la coopération de deux oncogènes (en l'occurrence *c-myc* et *ras*) pour transformer des fibroblastes embryonnaires primaires de rat (Land et al., 1983). Puis en 1988, l'équipe d'Adams montra que le gène *Bcl-2* promeut la survie des cellules hématopoïétiques et coopère avec *c-myc* pour immortaliser des cellules pré-B (Vaux et al., 1988). Plusieurs modèles animaux ont été développés afin de comprendre comment la dérégulation de c-Myc pouvait contribuer au processus de tumorigenèse, tels que des modèles Tet-on ou Tet-off permettant de réguler l'expression ectopique de c-Myc ou des modèles mimant des translocations chromosomiques. Ainsi, en 1990 le croisement de deux souris transgéniques, aboutissant à la naissance de souris double-transgéniques *Eμ-myc Eμ-*

Bcl-2 développant des tumeurs B plus rapidement que les souris simples transgéniques, ont confirmé la synergie et la coopération entre ces oncogènes (Strasser et al., 1990).

c-Myc collabore également avec les anti-oncogènes pRb et p53, comme cela a été montré dans les lymphomes de Burkitt. En effet, la dérégulation de la voie pRB consécutive à la méthylation du promoteur du gène p16^{INK4a} (altération épigénétique fréquente dans les BL), facilite la prolifération cellulaire induite par c-Myc. D'autre part, les mutations affectant la voie p14^{ARF}-MDM2-p53, protège les cellules de l'apoptose induite par c-Myc (Lindstrom and Wiman, 2002).

1.4.3. C-Myc : une cible thérapeutique pour les cancers humains ?

Les nombreux mécanismes par lesquels c-Myc est régulée, ainsi que les multiples voies de signalisation dans lesquelles elle intervient, font d'elle une protéine relativement complexe à étudier. Cependant, du fait de son importance dans la prolifération, et cela quelque soit le type cellulaire, c-Myc est une cible de choix pour le développement de nouveaux médicaments.

Des résultats issus d'études sur des modèles animaux utilisant un système Myc-inductible stipulent que l'inactivation de c-Myc pouvait engendrer la régression de tumeurs (Arvanitis and Felsher, 2006). Son inactivation entraîne un arrêt de la prolifération, la différenciation et l'apoptose (cf Tableau 2).

Modèles	Systèmes	Types de tumeurs	Réponse suite à l'inactivation	Mécanisme de régression de la tumeur
EμSR-tTA Tet-O-Myc	Tet-off	Lymphome T	Régression	Arrêt du cycle cellulaire, différenciation, apoptose
Eμ-tTa Tet-O-Myc	Tet-off	Lymphome B	Régression	Différenciation, apoptose
EμSR-tTA Tet-O-Myc	Tet-off	Ostéosarcome	Régression	Différenciation
MMTV-rtA Tet-O-Myc	Tet-on	Cancer du sein	Régression partielle	Non Déterminé
LAP-tTA Tet-O-Myc	Tet-on	Carcinome hépatique	Régression	Apoptose et différenciation
Plns-MycER TM	Tamoxifen	Tumeur pancréatique	Régression	Arrêt de la croissance, adhésion cellulaire, collapsus vasculaire, différenciation
Involucrin-MycER TM	Tamoxifen	Papillome (tumeur épithéliale)	Régression	Arrêt de la croissance et différenciation

Tableau 2 : Les conséquences de l'inactivation de c-Myc sur des modèles animaux.

(Arvanitis and Felsher, 2006).

Plusieurs études ont rapporté que le niveau d'expression de c-Myc est important lors du choix du traitement. Par exemple, le cancer de l'ovaire est traité par chimiothérapie à base de sels de platine ; cependant, de nombreuses résistances ont été remarquées. Il s'est avéré que les patientes répondant au traitement présentaient une forte expression de c-Myc, comparée aux patientes résistantes et étaient donc associées à un meilleur pronostic (Iba et al., 2004). D'autres auteurs ont montré que la réponse apoptotique induite par l'étoposide et la doxorubicine serait diminuée en l'absence de c-Myc (Grassilli et al., 2004). A l'inverse, en 2005, une étude a proposé qu'une diminution de l'expression de c-Myc sensibiliserait les cellules à la radiothérapie, dans le cas du traitement de mélanomes (Bucci et al., 2005). Enfin, il apparaît qu'un prétraitement avec un polypeptide inhibiteur de la dimérisation Myc-Max augmente les effets antiprolifératifs de la doxorubicine et de l'étoposide (Bidwell and Raucher, 2006). Ainsi, les traitements interférant avec les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et/ou l'apoptose, telles que les voies impliquant c-Myc, sont prometteurs s'ils sont combinés avec les thérapies anti-tumorales conventionnelles (Vita and Henriksson, 2006).

Aujourd'hui, les thérapies utilisant la chirurgie, avec ses conséquences invalidantes, les drogues cytotoxiques, ou encore l'irradiation, avec leurs nombreux effets secondaires, génèrent de nombreux effets délétères. Il devient donc primordial de développer de nouvelles thérapies plus spécifiques et beaucoup moins toxiques. C-Myc est activé dans de nombreuses variétés de tumeurs et le ciblage spécifique de cette protéine pourrait aboutir au traitement d'un large éventail de cancers. De plus, c-Myc est impliqué à la fois dans la prolifération et l'apoptose, les stratégies ayant pour but de cibler c-Myc pourraient être basées sur l'inhibition de la prolifération de la cellule tumorale et/ou sur l'augmentation de l'apoptose. Dans des systèmes expérimentaux, il est d'ailleurs montré que l'inactivation de c-Myc résulte en la régression de la tumeur et permet la différenciation (Felsher and Bishop, 1999a; Pelengaris et al., 2002b). En conséquence, c-Myc pourrait être ciblé à différents niveaux (ADN, ARN ou protéine) en utilisant des techniques diverses, telles que des oligonucléotides anti-sens, des si-ARN, des molécules inhibant la formation de l'hétérodimère Myc-Max, la transcription ou la traduction, ou au contraire, favoriser sa dégradation (Ponzielli et al., 2005; Arvanitis and Felsher, 2006; Vita and Henriksson, 2006). Ces stratégies pourraient être utilisées seules ou combinées avec les thérapies couramment utilisées dans le traitement des tumeurs associées à c-Myc.

Cependant, c-Myc est une protéine ubiquitaire. Il faut donc être prudent quant aux effets secondaires que pourrait engendrer un tel traitement. Qu'en serait-il des tissus à renouvellement

rapide ? Il est évident qu'en ciblant c-Myc, il faut être attentif à ne cibler que la cellule tumorale. Il peut alors être intéressant d'utiliser des techniques de vectorisation.

Les altérations du programme génétique de la cellule tumorale par rapport à sa contre-partie normale physiologique induit *de facto* des différences d'expression en protéines. Des auteurs ont utilisés cette propriété en remarquant que certaines cellules tumorales étaient plus sensibles à l'expression du gène de la thymidine kinase du virus de l'*herpès simplex* (HSV-TK). Ainsi, ils ont élaboré une construction avec le gène HSV-TK contenant 4 séquences *E-box* en amont du promoteur, qu'ils ont introduit dans des cellules de cancer du poumon. Ils ont observé, *in vitro*, que l'expression du gène HSV-TK dépend de la quantité de c-Myc dans la cellule. De plus, *in vivo* (souris BALB/c *nu/nu*) les auteurs ont remarqué que la croissance des cellules surexprimant c-Myc et contenant le gène HSV-TK, pouvait être réprimée par le ganciclovir (Kumagai et al., 1996). Ces observations les ont conduits à fabriquer un vecteur adénoviral contenant la séquence MycTK. L'infection par cet adénovirus suivi du traitement par le ganciclovir, cible spécifiquement les cellules surexprimant c-Myc et stoppe leur croissance. Les essais *in vivo*, sur la souris BALB/c *nu/nu*, n'ont par ailleurs pas montré d'effets secondaires (Nishino et al., 2001).

Une autre façon d'utiliser ces vecteurs adénoviraux est de mettre sous leur contrôle un gène codant une enzyme catalysant la conversion d'une pro-drogue en sa forme active, il s'agit de la technique VDEPT (*Viral Directed Enzyme Prodrug Therapy*). Des auteurs ont décrit la régulation de l'expression par N-Myc de l'enzyme *carboxylesterase* (CE), via le promoteur de l'*ODC*, qui active la pro-drogue CPT-11 (Camptosar ou Iritonecan) (Pawlik et al., 2000). Par la suite, cette équipe a développé un vecteur contenant en amont du promoteur de l'*ODC* six séquences *E-box* et ont montré, sur des lignées de neuroblastome (surexprimant N-Myc), une activation plus efficace de l'enzyme CE, permettant une meilleure sensibilisation des cellules au CPT-11 (Iyengar et al., 2001).

C-Myc est donc une cible thérapeutique potentielle. Outre les cancers solides, cette cible est également intéressante dans les hémopathies malignes, et notamment les lymphomes B agressifs. Dans le chapitre suivant, relatif à la cellule B dans un premier temps, puis aux lymphoproliférations affectant cette cellule dans un second temps, nous reviendrons sur l'implication de cet oncogène dans la lymphomagenèse.

2. DE LA CELLULE B AUX LYMPHOPROLIFERATIONS B

Le système immunitaire est un système de défense consistant en un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant à un organisme de discriminer ce qui lui est propre (le "soi") et de le tolérer, de ce qui lui est étranger (le "non soi") afin de le rejeter. Cette fonction permet ainsi d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes (d'origine virale, bactérienne ou parasitaire) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. Il existe deux principaux types de mécanismes de défense : les mécanismes de défense non spécifique (ou innée), faisant intervenir les muqueuses, la peau, la sueur, l'acidité gastrique, les cellules phagocytaires (polynucléaires et monocytes/macrophages) ou encore les larmes ; et les mécanismes de défenses spécifiques impliquant l'action des lymphocytes et des immunoglobulines. Parmi ces mécanismes spécifiques, deux types de réactions immunitaires sont distinguées :

✓ La réaction à médiation cellulaire : Elle permet d'éliminer les cellules infectées par des pathogènes ou les cellules cancéreuses et s'effectue via les cellules T.

✓ La réaction à médiation humorale : Elle est dirigée contre les agents pathogènes circulant dans les liquides du corps humain (autrefois appelés *humeur*) et implique les immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac) produites par les plasmocytes (dernier stade de maturation du lymphocyte B).

Cette deuxième partie bibliographique traite spécifiquement du lymphocyte B, modèle d'étude de ces travaux de thèse. Dans un premier temps, nous étudierons la différenciation lymphocytaire B, processus reposant sur un programme complexe d'activation génique contrôlant, d'une part la transcription des gènes d'Ig, et d'autre part leur accessibilité à des remaniements par recombinaison ou mutation. Puis nous décrirons plus particulièrement le locus des gènes des chaînes lourdes des Ig, au sein duquel l'oncogène *c-myc* est transloqué dans le cas des lymphomes de Burkitt. Nous nous efforcerons par la suite d'expliquer comment la cellule B peut devenir tumorale. Ainsi, nous établirons un état des lieux sur les différentes lymphoproliférations B et nous ferons un point sur le principal virus transformant de cette cellule : le virus d'Epstein-Barr. Nous finirons par décrire plus en détail le lymphome Burkitt, afin de mettre en lumière les rôles de *c-myc* et de l'EBV dans cette hémopathie maligne.

2.1. Le développement B

Le développement des lymphocytes B à partir de progéniteurs pluripotents est un processus complexe et finement régulé, initié dès les stades de la vie embryonnaire et se poursuivant tout au long de la vie de l'organisme. On distingue deux grandes phases : la phase indépendante de l'antigène qui a lieu dans la moelle osseuse et la phase dépendante de l'antigène qui se produit dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces deux grandes phases sont intimement liées au processus permettant à la cellule B de produire des molécules effectrices : les Ig, capables de se lier spécifiquement à un antigène donné en vue de le neutraliser.

Les Ig sont des hétérodimères protéiques glycosylés, d'environ 150 kDa. Elles sont composées de deux chaînes lourdes identiques (H - *Heavy*) et de deux chaînes légères identiques (L - *Light*) (cf. **Figure 9**).

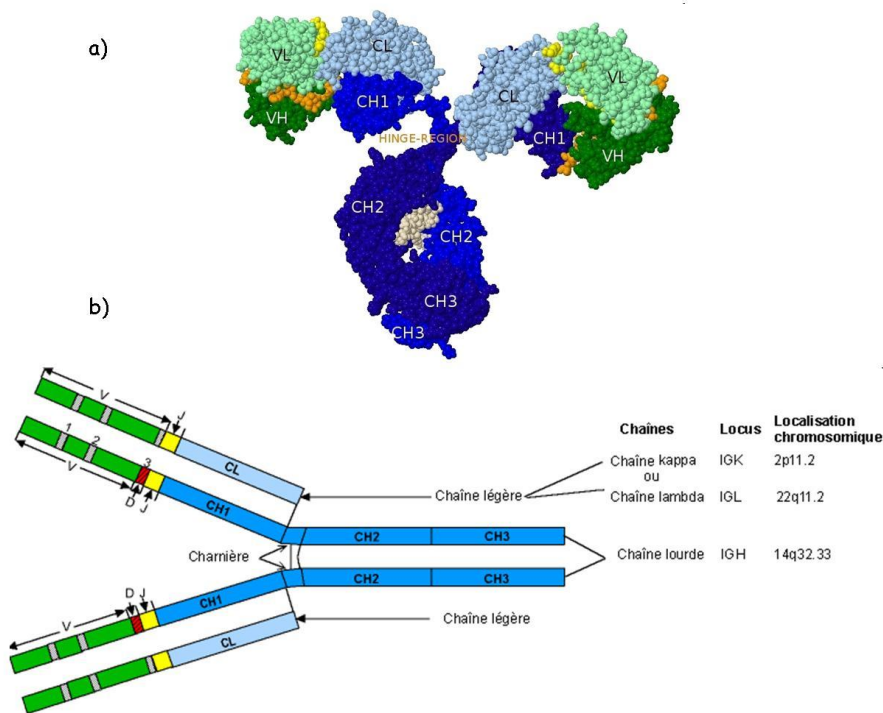


Figure 9 : Représentations d'une immunoglobuline.

a) : Représentation tridimensionnelle d'une IgG humaine. V_H : domaine de la chaîne lourde (en vert, les régions V et en orange, les régions D et J), V_L : domaine de la chaîne légère (en vert, les régions V et en jaune, les régions J). Les 3 domaines C_H représentent les domaines constants de la chaîne lourde et C_L représente le domaine constant de la chaîne légère. La "Hinge région" est la région charnière.

b) : Représentation bidimensionnelle de la même Ig, les codes couleurs étant identiques. (Lefranc and Lefranc, 2002).

Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont quant à elles liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxy-terminale. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères constitue le site de fixation à l'antigène. Les domaines constants des chaînes lourdes confèrent quant à eux, les propriétés effectrices. Il existe deux types de chaînes légères (κ et λ) qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes des chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ , et α), définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA.

Comme évoqué dans l'introduction du chapitre, nous allons décrire ici le processus de différenciation du lymphocyte B, avant de nous intéresser plus particulièrement au locus des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines et à la région située en 3' de ce locus.

2.1.1. La phase indépendante de l'antigène

Les étapes de différenciation qui conduisent la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B immature émergent se déroulent dans la moelle osseuse en l'absence de stimulation antigénique. Elles dépendent à la fois des remaniements des segments de gènes codant le BCR (*B-Cell Receptor*) et de signaux émanant du microenvironnement lymphohématopoïétique. Des modèles de souris présentant des altérations sur les gènes des Ig ont permis d'élucider les rôles des facteurs transcriptionnels, des cytokines et de leurs récepteurs dans le développement B.

La genèse d'Ig fonctionnelle se produit par recombinaison génique des régions variables des gènes des chaînes lourdes et légères. L'exon codant pour la région variable des chaînes lourdes des Ig est généré par la jonction de trois types de segments de gènes, les segments V_H (variable), les segments D_H (diversité) et les segments J_H (jonction), alors que la formation de l'exon codant pour la région variable de la chaîne légère ne nécessite que la jonction d'un segment V_L à un segment J_L . Ces réarrangements géniques, dont le but est de générer un répertoire aléatoire de spécificités antigéniques, sont réalisés de façon séquentielle et sont étroitement liés aux stades de différenciation du lignage B (cf. **Figure 10** et **Figure 11**).

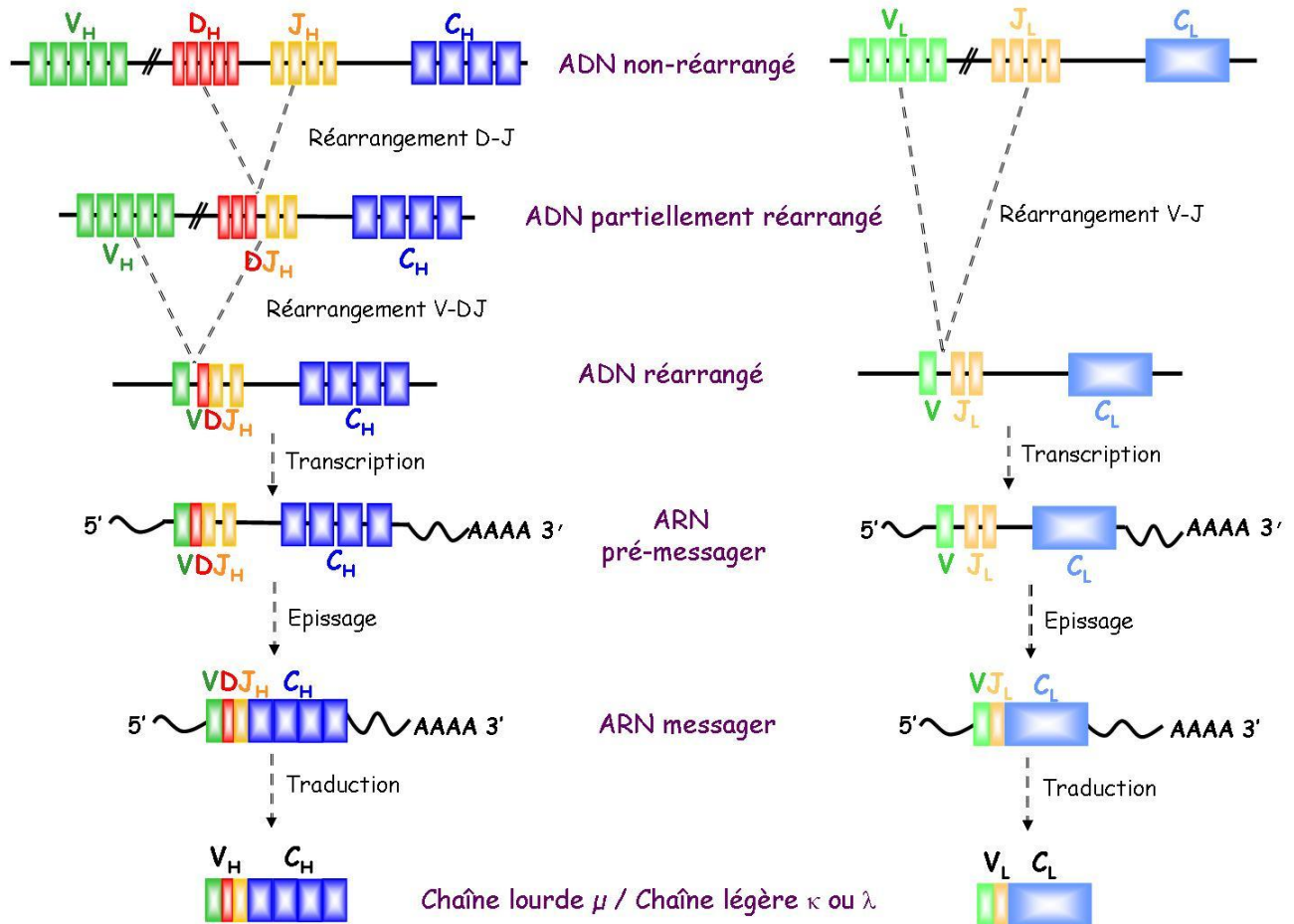


Figure 10 : Les réarrangements VDJ.

A gauche : réarrangements VDJ sur le locus des gènes des chaînes lourdes (H), aboutissant à la formation d'une chaîne lourde μ .

A droite : réarrangement sur le locus des gènes des chaînes légères (L), aboutissant à la formation d'une chaîne légère κ ou λ .

D'après (Lefranc and Lefranc, 2002).

2.1.1.1. Stade pré-proB

Une partie des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) dérive en progéniteurs lymphoïdes communs (CLPs) sous l'action des facteurs de transcription Ikaros et PU.1. Puis, l'expression des facteurs E2A, EBF et Pax5 autorise l'entrée du CLP dans le lignage B. Cependant, les décisions très précoces permettant l'engagement de la cellule souche hématopoïétique dans le lignage lymphocytaire B sont encore très discutées (Ye and Graf, 2007). Les précurseurs B les plus immatures dans la moelle osseuse, appelés cellules pré-proB, expriment alors les marqueurs CD45 (B220, chez la souris), CD43 et c-kit mais n'expriment pas le CD19. Elles expriment faiblement les

gènes *Rag-1* et *Rag-2* (*Recombination Activating Gene*), responsables du réarrangement des gènes d'immunoglobulines (Ye and Graf, 2007) (cf. **Figure 11**).

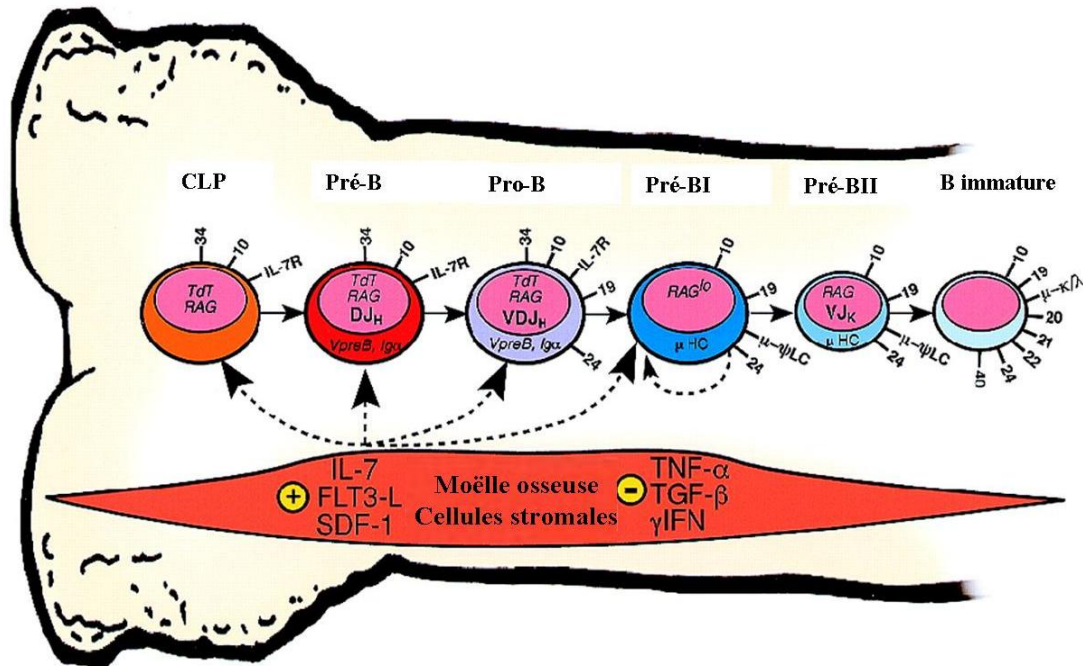


Figure 11 : Le développement B dans la moelle osseuse.

D'après (LeBien, 2000).

2.1.1.2. Stade pro-B

Les auteurs ne sont pas tous en accord sur le stade auquel débutent les recombinaisons VDJ. Certains suggèrent que le rapprochement entre un segment D_H et un segment J_H commence dès le stade pré-proB suite à l'expression des gènes *Rag*, avec par la suite, le rapprochement d'un segment V_H du segment DJ_H déjà réarrangé, au stade pro-B (Fuxa and Skok, 2007); d'autres pensent que ce premier réarrangement marque le stade proB (Martensson et al., 2007). Dans le même journal qui a publié en 2007 plusieurs revues sur le sujet, les données sont contradictoires. Cependant tous s'accordent sur le fait qu'à ce stade, le marqueur spécifique du lignage B, CD19, gène cible de PAX5 (facteur signant le lignage lymphocytaire B) apparaît. Les cellules expriment également le CD10, le CD34 et la TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) (LeBien, 2000) (cf. **Figure 11**).

Si le réarrangement VDJ est productif, alors une chaîne lourde μHC est produite. Là encore la détection de cette chaîne μHC à ce stade est sujette à controverse. Néanmoins, des études ont montré que cette chaîne est détectable dans 5 à 10 % des cellules pro-B CD19+/CD34+. Le réarrangement VDJ étant essentiel à la différenciation de la cellule pro-B en cellule pré-B, les

cellules pro-B qui n'ont pas réarrangé de façon fonctionnelle leurs segments VDJ sur l'un ou l'autre allèle entrent alors en apoptose (LeBien, 2000).

En parallèle, ces cellules expriment une pseudo-chaîne légère (SLC – *Surrogate Light Chain*), composée des protéines VpréB et $\lambda 5$, ainsi que les hétérodimères Iga/Ig β (CD79a et CD79b). Des travaux sur ce sujet ont démontré qu'une signalisation peut être induite par ce complexe, permettant le recrutement de protéines kinases (Nagata et al., 1997).

2.1.1.3. Stade pré-B

Le passage de la cellule pro-B en cellule pré-B est caractérisé par la perte des marqueurs CD34 et TdT et l'acquisition de la chaîne lourde μ HC cytoplasmique dans plus de 95% des cellules pro-B. Notons également l'apparition du marqueur CD25. La chaîne lourde μ HC va s'associer à la pseudo-chaîne légère SLC et aux protéines Iga/Ig β . Le complexe est ensuite exporté à la surface de la cellule et forme le pré-BCR. Tous les auteurs s'accordent sur le fait que la formation du pré-BCR se déroule lorsque la cellule est au stade pré-B. Les cellules pré-B sont généralement subdivisées en deux sous-groupes : les cellules pré-BI (ou *large pre-B*, proliférantes) et les cellules pré-BII (ou *small pre-B*, post-mitotiques), sous-groupes basés sur l'analyse du cycle cellulaire (LeBien, 2000).

Au stade pré-BI, l'expression du pré-BCR entraîne une diminution transitoire des gènes *Rag*, qui de ce fait inhibe les réarrangements sur le locus des chaînes lourdes : c'est l'exclusion allélique au locus des chaînes lourdes. Ce mécanisme est crucial puisqu'il permet à la cellule d'être monospécifique. Le produit protéique d'un réarrangement productif V-DJ sur un allèle inhibe le réarrangement V-DJ sur l'autre allèle par le biais d'un signal transmis par les pré-BCR associé au complexe Iga/Ig β .

Au stade pré-BII, la réexpression des gènes *Rag* permet l'activation du réarrangement des gènes du locus des chaînes légères, en premier lieu sur la chaîne κ , puis, si le réarrangement n'est pas fonctionnel, sur la chaîne λ . Il s'ensuit une diminution de l'expression des gènes *Rag*, c'est le phénomène d'exclusion allélique au locus des chaînes légères. A ce stade, la réexpression des gènes *Rag* ne permet pas de nouveaux réarrangements au locus des chaînes lourdes puisque celui-ci n'est alors plus accessible (Corcoran, 2005). (cf. **Figure 11**).

2.1.1.4. Stade B immature

Ce stade est caractérisé par la production d'une chaîne légère fonctionnelle, remplaçant alors la pseudo-chaîne légère et donnant naissance à une IgM de surface (cf. **Figure 11**). Celle-ci confère à la cellule une spécificité de la reconnaissance à l'antigène. En revanche, cette IgM ne doit pas

posséder de spécificité contre le soi. Trois mécanismes de neutralisation des lymphocytes auto-réactifs sont décrits : l'anergie clonale (la cellule est inactivée et ne répond pas), la délétion clonale (destruction du clone auto-réactif par apoptose) et la correction du récepteur (ou *BCR editing*). Ce dernier processus permet de nouveaux réarrangements des gènes des Ig déjà réarrangés de la chaîne légère, modifiant ainsi la spécificité antigénique de l'Ig résultante (Edry and Melamed, 2004). Ces cellules expriment les marqueurs CD20, CD22 et CD40.

Les cellules B immatures exprimant un BCR non auto-réactif quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes périphériques. A la périphérie, ces cellules, qui sont alors des cellules B matures naïves IgM+, IgD+ peuvent subir les dernières étapes de maturation suite à leur rencontre avec l'antigène.

2.1.2. La phase dépendante de l'antigène

La cellule B mature naïve IgM+ IgD+ circule entre les différents organes lymphoïdes secondaires à la rencontre de l'antigène dont elles sont spécifiques. Leur demi-vie est de 3 jours. Si la rencontre avec l'antigène a lieu, la cellule B va répondre par une expansion clonale et initier la formation de centres germinatifs, au sein desquels elle se différencie afin de produire une Ig de meilleure affinité et de meilleure spécificité. Ce clone B portant une Ig spécifique d'un antigène donné va finalement se différencier d'une part en cellules B mémoires et d'autre part en cellules B sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes.

2.1.2.1. Structure et développement du centre germinatif

Lors de la réponse T-dépendante à un antigène, les centres germinatifs sont formés par les cellules B proliférantes dans les follicules des tissus lymphoïdes périphériques, que sont la rate, les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et les amygdales. Le microenvironnement des centres germinatifs des organes lymphoïdes périphériques est le site principal de production des cellules B mémoires et des plasmocytes produisant des anticorps de haute affinité (MacLennan, 1994; Feuillard and Raphaël, 2000; Klein and Dalla-Favera, 2008).

Le développement d'une réponse B primaire T-dépendante est initiée dans la zone T interfolliculaire et implique la coopération entre les lymphocytes B IgM+ IgD+ activés par l'antigène, les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène (CPA) (MacLennan, 1994). L'initiation de cette réponse requiert l'interaction entre les molécules de co-stimulation exprimées à la surface des cellules B et leur ligands, exprimés quant à eux à la surface

des cellules T et/ou des CPA. L'interaction la plus importante est celle entre le CD40 (exprimé par toutes les cellules B) et son ligand le CD154, ou CD40L (exprimé par les T *helper*).

Cette première phase de la réponse immune B correspond à la formation de foyers oligoclonaux de cellules B dites "B-blastiques", proliférant et se différenciant rapidement en plasmocytes à IgM, à courte durée de vie (Liu et al., 1991). Quelques uns de ces lymphocytes B-blastiques acquièrent la capacité de migrer au sein des follicules primaires adjacents, structure formée de cellules B IgM⁺ IgD⁺ recirculantes et insérées dans un réseau de cellules folliculaires dendritiques (FDC). A ce stade, les cellules B commencent à proliférer rapidement alors que les cellules B IgM⁺ IgD⁺ présentes sont repoussées sur le côté pour former la zone du manteau entourant les centres germinatifs et permettant ainsi la création du follicule secondaire.

Après quelques jours d'intense prolifération, apparaît le centre germinatif, reconnaissable par ces deux principales zones : la zone sombre, constituée presque exclusivement de cellules B proliférantes (les centroblastes) et la zone claire, constituée de petites cellules ne se divisant pas (les centrocytes) enchâssées dans un maillage de FDC (*Follicular Dendritic Cells*), de cellules T et de macrophages. C'est dans le centre germinatif que sont initiés les deux principaux mécanismes permettant la production d'une Ig de très haute affinité. Au stade centroblaste, les mutations somatiques ciblant les gènes des régions variables modifient, en plus ou en moins, l'affinité de l'Ig pour l'antigène. Ces cellules sont sélectionnées par interaction avec l'antigène exposé à l'état natif sous forme de complexe immun par la FDC. Les centroblastes deviennent alors des centrocytes qui effectuent la commutation isotypique, avec pour effet, la modification de la classe de l'Ig. Puis, ces centrocytes se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Le centre germinatif atteint sa taille maximale au bout de deux semaines, puis la structure involue avant de disparaître (cf. Figure 12).

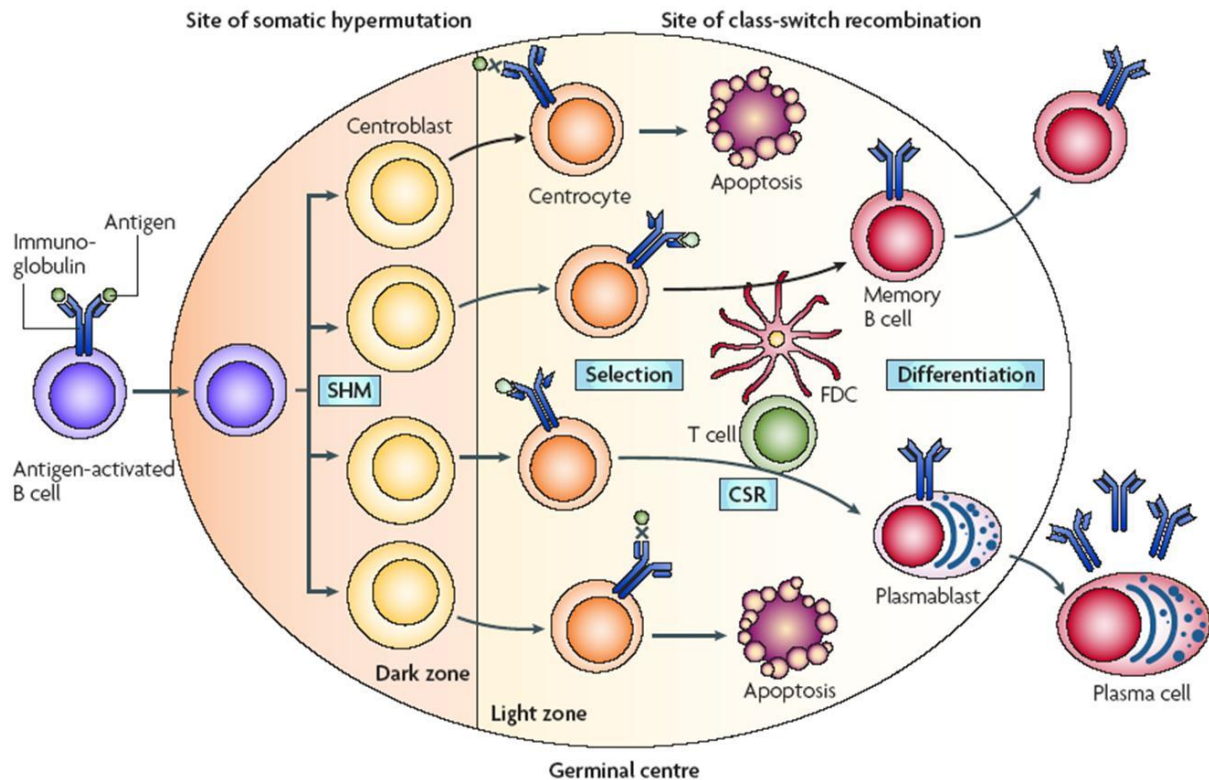


Figure 12 : Le centre germinatif.

Les cellules B activées par l'antigène subissent une expansion clonale et se différencient en centroblastes dans la zone sombre du centre germinatif. Durant leur prolifération, le processus d'hypermutation somatique introduit des mutations dans les régions V(D)J. Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes et migrent vers la zone claire où les cellules sont sélectionnées pour leur affinité à lier l'antigène qui leur est présenté sous forme de complexe immun par les FDC et les cellules Th. Les centrocytes n'ayant pas produit une Ig adéquate sont éliminés par apoptose. Ceux ayant une Ig affine pour l'antigène subissent alors la commutation de classe. Finalement, les centrocytes sélectionnés vont se différencier en cellules B mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'Ig. (Klein and Dalla-Favera, 2008).

Les protéines membranaires CD40, CD40L, OX40, OX40L, CD95, et des membres de la famille B7, jouent un rôle crucial dans la genèse du centre germinatif. L'activation des cellules T par les CPA implique les interactions CD28/CTLA4-molécules de la famille B7 et OX40-OX40L. Les souris déficientes pour CTLA4 et CD28 ne peuvent produire de centres germinatifs (Lane et al., 1994; Ferguson et al., 1996). En revanche, l'injection d'anticorps agoniste anti-CD28 dans les souris déficientes pour CTLA4 restaure la capacité à former ces centres germinatifs. De plus, les lymphocytes T activés expriment le CD40L permettant ainsi l'activation des CPA, via CD40. Cette interaction augmente l'expression de OX40L à la surface des CPA (Walker et al., 2000). La costimulation des cellules T CD4+ par CD28 et OX40 induit leur migration vers les centres germinatifs. Notons que la migration des cellules T dans le centre germinatif est associée à un profil

cytokinique de type Th2, avec sécrétion d'Il-4 (Butch et al., 1993). Enfin, la formation des centres germinatifs nécessite des interactions entre les lymphocytes B et les FDC, impliquant le TNF α (Matsumoto et al., 1996).

In fine, trois phases de la réponse immune T-dépendante peuvent être décrites. La première phase, précédant l'entrée dans le centre germinatif (ou pré-centre germinatif), correspond à l'émergence des lymphocytes B vierges, à la recirculation des lymphocytes B IgM⁺ IgD⁺, à l'expansion des lymphocytes B-blastiques dans les zones T interfolliculaires et à la production de plasmocytes à IgM. La deuxième phase correspond à la formation des centres germinatifs, à la genèse des centroblastes et centrocytes et donc à l'établissement d'une réponse immune B secondaire. La troisième phase, ou phase post-centre germinatif, implique la différenciation des lymphocytes B mémoires dans la zone marginale ainsi que celle des plasmocytes dans la moelle osseuse et la *lamina propria*.

2.1.2.2. Stade centroblaste

Une des caractéristiques des centroblastes est leur fort taux de prolifération, pré-requis à la génération rapide d'un grand nombre d'Ig modifiées à partir des quelques cellules B sélectionnées pour leur liaison à l'antigène (cf. **Figure 12**). Le profil d'expression des gènes d'une cellule B activée par un antigène et se différenciant en centroblaste, est associé à une forte régulation positive des gènes associés à la prolifération cellulaire ainsi qu'à une régulation négative des gènes codant des régulateurs négatifs de la prolifération, tel que p21 (Klein et al., 2003). En outre, la réponse aux dommages de l'ADN est supprimée (Phan and Dalla-Favera, 2004). Ces cellules n'expriment pas les facteurs anti-apoptotiques, dont Bcl-2, alors qu'elles expriment de nombreuses protéines induisant l'apoptose (Fas, p53 et Bax), permettant l'élimination rapide de cellules B présentant de nouvelles mutations dans leurs Ig s'avérant non-fonctionnelles (Martinez-Valdez et al., 1996). En ce qui concerne l'expression de c-Myc, les études sont controversées. En 1996, cette même équipe montre que c-Myc est exprimé au stade centroblaste et propose que la protéine est associée au fort taux prolifératif de ces cellules (Martinez-Valdez et al., 1996). A l'inverse, en 2003, l'équipe de Dalla-Favera établit le transcriptome des cellules B du centre germinatif et remarque de façon surprenante, l'absence de c-Myc dans les centroblastes. Ils proposent que ce résultat s'explique par le fait que c-Myc, induisant l'instabilité génomique et des recombinaisons, serait "indésirable" à ce stade du fait des nombreuses cassures d'ADN permettant les recombinaisons somatiques. (Klein et al., 2003).

C'est effectivement à ce stade que l'affinité des Ig pour l'antigène est modifiée. Le processus de mutations somatiques introduit des changements de nucléotides dans les régions variables déjà réarrangées, à une fréquence de 10^{-3} à 10^{-4} modifications par pb et par génération. Par sélection par l'antigène, ces mutations sont préférentiellement accumulées aux régions hypervariables (CDRs – *Complementarity-Determining Regions*) déterminant la complémentarité avec l'antigène. Ce processus est associé à des cassures double-brin de l'ADN et requiert l'activité d'AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), enzyme catalysant la déamination de résidus déoxycytidine de l'ADN. AID entraîne une déamination des cytosines en uraciles dans l'ADN. L'uracile doit alors être réparé par les mécanismes de réplication et/ou de réparation. Si la mutation est ignorée et considérée comme une thymine par les ADN polymérases répliquatives, il y a alors transition C vers T après réplication. Si la mutation est éliminée par l'uracyle glycosylase (UNG - *Uracyl-DNA Glycosylase*), créant alors un site abasique, ce site est la cible d'une endonucléase de la voie BER (*Base Excision Repair*) qui va cliver l'ADN. Les ADN polymérases translésionnelles insèrent alors un des quatre nucléotides en fonction de leur spécificité, aboutissant à une transition, une transversion ou à la reconstitution de la cytosine initiale. (Di Noia and Neuberger, 2007). Ce processus de SHM (*Somatic Hypermutation*) a par ailleurs été montré comme ciblant d'autres gènes comme *c-myc*, *Bcl-6* ou *BSAP/PAX5* (Pasqualucci et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001).

Le gène *Bcl-6*, identifié de par sa translocation dans le lymphome diffus à grandes cellules, est un régulateur du développement des cellules B du centre germinatif (Ye et al., 1993). Ce facteur est un répresseur transcriptionnel, qui, au stade centroblaste, inhibe les gènes impliqués dans l'activation de la cellule B (*CD69*, *STAT1*, *CD80*), réprime les gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire, inhibe la réponse au stress génotoxique (p53, ATR), inhibe la différenciation plasmocytaire (*PRDM1/Blimp-1*) et la différenciation en cellule B mémoire (Klein and Dalla-Favera, 2008).

2.1.2.3. Stade centrocyte

Un centroblaste exprimant une Ig nouvellement générée suite aux mutations somatiques est testé pour sa capacité à lier l'antigène. Ce test intervient dans la zone claire du centre germinatif, par l'intermédiaire des FDC qui exposent l'antigène à haute concentration sous forme de complexes immuns. La stimulation du BCR, couplée aux signaux de costimulation transmis par les cellules T, fournis des signaux de survie à la cellule B. A l'inverse, l'échec de la liaison du BCR à l'antigène induit la mort de la cellule B (cf. ***Figure 12***).

✓ Mécanisme de la commutation de classe (CSR) : La commutation isotypique (CSR - *Class Switch Recombination*) rapproche, par recombinaison somatique, le segment VDJ réarrangé et possédant une bonne affinité pour l'antigène d'un nouveau segment constant de classe différente (IgG, IgA ou IgE) (cf. **Figure 13**). Chaque segment constant de la chaîne lourde C_H (sauf C_δ), est précédé d'une séquence d'ADN appelée région S (pour *Switch*). Ces séquences sont constituées de motifs répétés riches en G/C, de 1 à 12 kb. En réponse à des cytokines, la transcription est initiée à partir d'un promoteur I, précédant tous les exons C_H concernés par la CSR. La transcription à travers les deux régions S concernées génère des boucles R (*R loop*), engendrant de l'ADN simple-brin, substrat pour l'enzyme AID. AID déamine les résidus cytidine en résidus uracile, retiré par UNG créant un site abasique, traité par APE1 (*apurinic/aprimidic endonuclease1*) qui génère alors une brèche. Ces cassures sont réassociées par un processus nécessitant l'intervention de nombreux facteurs protéiques, tels que H2AX (*Histone 2A family member X*), 53BP1 (*p53 Binding Protein*), LR1 (*Lipopolysaccharide-Responsive protein 1*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), MLH (*MutL Homologue 1*) et la DNA-PKcs (sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendant de l'ADN). Le mécanisme de la commutation de classe s'achève avec l'intervention de la voie NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*, comprenant entre autres les protéines Ku70, Ku80, Artémis et XRCC4) qui associe les deux régions switch impliquées (la région S donneuse S_μ et la région S acceptrice en amont du gène constant concerné) et rapproche ainsi le segment VDJ d'un nouveau segment constant. L'ADN intermédiaire, sous forme circulaire est éliminé (cf. **Figure 13**) (Chaudhuri and Alt, 2004; Stavnezer et al., 2008).

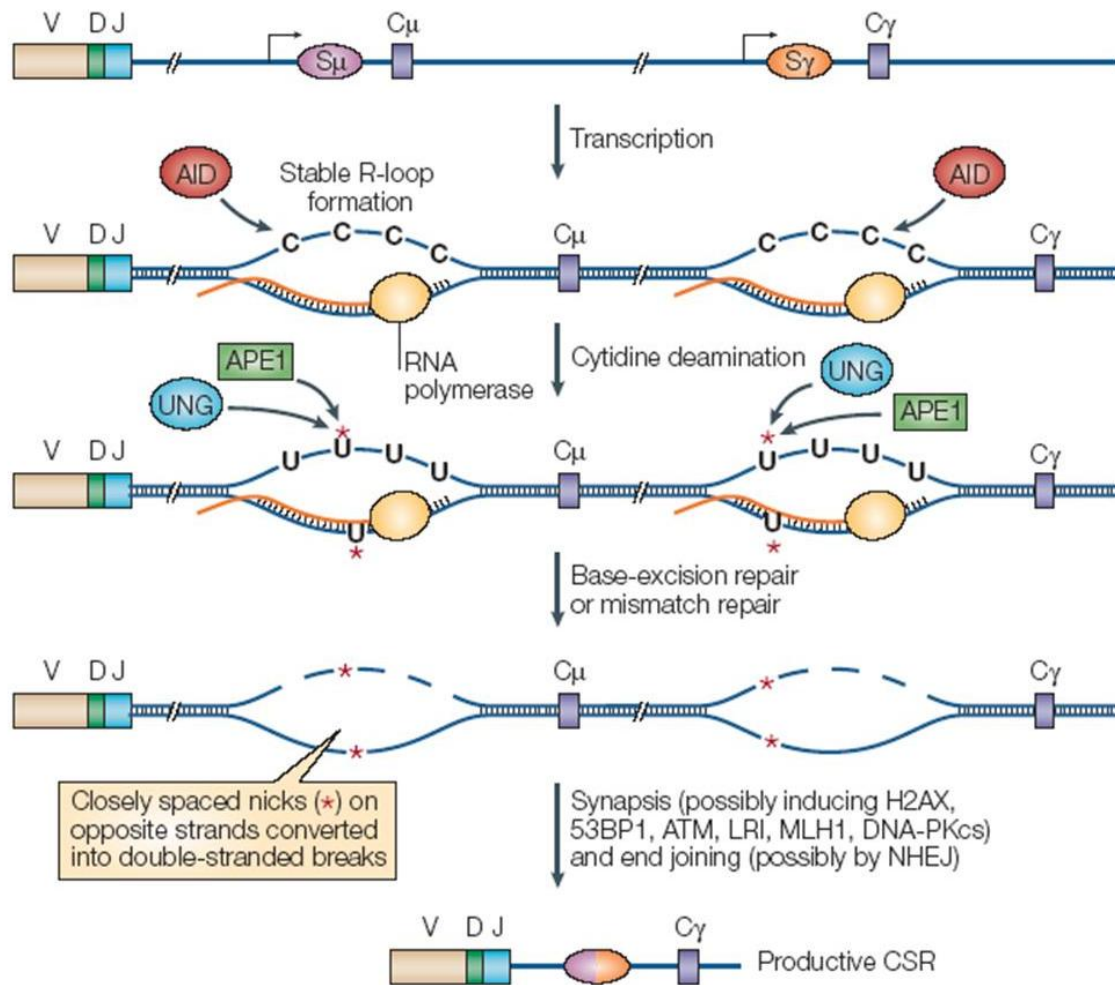


Figure 13 : Mécanisme de la recombinaison de classe.

L'initiation de la transcription se fait en amont des deux régions S impliquées créant ainsi une boucle R. L'action respective des enzymes AID, UNG et APE1 génère des mutations puis des cassures qui seront suivies d'une étape de réparation impliquant le mécanisme NHEJ. Le segment VDJ est ainsi rapproché d'un nouveau segment constant. (Chaudhuri and Alt, 2004).

✓ Les isotypes : L'IgG est l'isotype prédominant dans le sang. Quatre sous classes sont décrites : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgG sont particulièrement efficaces dans la neutralisation des toxines, des bactéries et des virus. Les IgA, dont on observe deux sous-classes IgA1 et IgA2, sont prédominantes dans les sécrétions et les muqueuses. Elles sont associées à l'agglutination et ont un rôle dans la neutralisation des bactéries et des virus. Enfin, les IgE sont impliquées dans la défense parasitaire et les réactions allergiques. Les mastocytes et basophiles expriment des récepteurs à haute affinité pour IgE (Fc ϵ RI) pouvant lier les IgE monomériques en l'absence de l'antigène. Les antigènes spécifiques induisent l'agrégation des complexes IgE-Fc ϵ RI entraînant la sécrétion d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité.

La commutation de classe est principalement activée par les signaux CD40 et/ou TLR (*Toll-like Receptor*). De plus, les cytokines produites par les cellules T CD4 déterminent l'isotype vers lequel la cellule B va commuter, à partir des promoteurs I, localisés en 5' de chaque région S acceptrices. Ces promoteurs contiennent des éléments de réponse aux cytokines, tels que des sites de fixation pour NF- κ B, facteur induit par CD40 (Cogné and Birshtein, 2004; Stavnezer et al., 2008). Plus spécifiquement, chez l'homme, l'Il-4 permet la commutation vers IgG4 et IgE et le TGF- β vers IgA1 et IgA2. Chez la souris, L'Il-4 induit la commutation vers IgG1 et IgE, l'IFN- γ vers IgG3 et IgG2a et le TGF- β vers IgG2b et IgA.

2.1.2.4. La différenciation des cellules B post-centres germinatifs

Les signaux qui induisent la transition du centrocyte soit en cellule plasmocytaire soit en cellule B mémoire sont à ce jour mal connus. Cependant, de nombreux facteurs de transcription ont été identifiés (cf. **Figure 14**) (Shapiro-Shelef and Calame, 2005; Klein and Dalla-Favera, 2008).

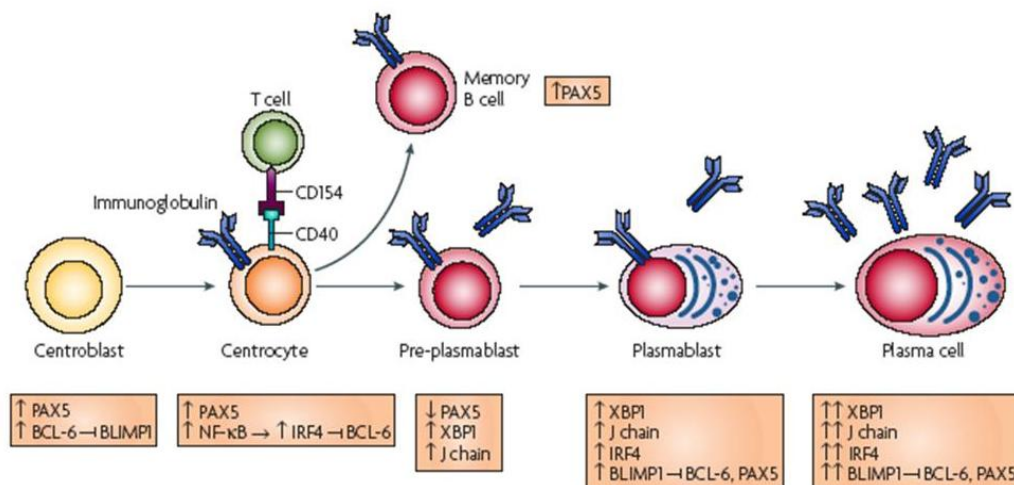


Figure 14 : Programme transcriptionnel du développement B dans le centre germinatif et post-centre germinatif.

(Klein and Dalla-Favera, 2008).

✓ La différenciation plasmocytaire : La régulation négative de Bcl-6 représente la première étape de la différenciation plasmocytaire, aboutissant à la génération d'un "pré-plasmablaste" sécrétant de faibles quantités d'Ac. Les signaux reçus par les cellules immunitaires dans la zone claire diminuent l'expression de Bcl-6 dans les centrocytes, permettant alors la levée de répression de l'expression de Blimp-1 et par conséquent l'engagement vers la différenciation plasmocytaire (cf. **Figure 14**) (Angelin-Duclos et al., 2000; Shaffer et al., 2000). Le second évènement requis pour la différenciation post-centre germinatif est la régulation négative de PAX5 (cf. **Figure 14**)

(Cobaleda et al., 2007). L'établissement d'une lignée B (DT40) déficiente pour PAX5 induit un programme de différenciation en cellule plasmocytaire avec une augmentation de l'expression des facteurs Blimp-1 et XBP1, caractéristiques de ce stade, et la diminution de l'expression de Bcl-6 ; ces altérations étant rétablies après la restauration de l'expression de PAX5. (Nera et al., 2006).

Blimp-1 est un régulateur crucial de la différenciation plasmocytaire. Les souris déficientes pour *PRDM1* (gène codant pour Blimp-1) ne peuvent générer de cellules plasmocytaires (Shapiro-Shelef et al., 2003). Un autre facteur, agissant en aval de Blimp-1, permet aux plasmocytes de sécréter les Ig : il s'agit de XBP1. Des cellules *PRDM1*^{-/-} ne régulent plus positivement la plupart des gènes spécifiques aux cellules plasmocytaires, dont *XBP1*. L'expression ectopique de ce facteur induit un large spectre de gènes impliqués dans la sécrétion. XBP1 augmente la taille des cellules, le contenu lysosomal, la masse et l'activité mitochondriale, le nombre de ribosomes et la synthèse de protéines. En bref, XBP1 coordonne divers changements dans la structure et la fonction cellulaire aboutissant à un phénotype caractéristique de cellules sécrétrices professionnelles (Shaffer et al., 2004). Enfin, IRF4 est également un régulateur clef de la différenciation plasmocytaire. Ce facteur agit en parallèle de Blimp-1 et réprime Bcl-6 (Klein et al., 2006; Saito et al., 2007).

Ainsi, Blimp-1, IRF-4 et XBP1 sont trois facteurs indispensables à la différenciation plasmocytaire terminale (cf. **Figure 14**) (Reimold et al., 2001; Shapiro-Shelef et al., 2003; Klein et al., 2006).

✓ La différenciation en cellules B mémoires : Les étapes et les facteurs permettant la différenciation d'un centrocyte en une cellule B mémoire sont moins connus que celles et ceux de la différenciation plasmocytaire (Klein and Dalla-Favera, 2008). On sait cependant que les cellules B mémoires expriment le facteur PAX5 (cf. **Figure 14**). Par contre, le rôle de Bcl-6 reste à clarifier. En effet, selon une étude, la forme phosphorylée de STAT5 engagerait la différenciation du centrocyte en cellules B mémoires, via la régulation de l'expression de Bcl-6 (Scheeren et al., 2005). Cependant, des souris déficientes pour *Bcl-6* développent des cellules présentant un profil de cellules B mémoires, montrant que le rôle de STAT5 doit encore être étudié (Toyama et al., 2002). De plus, *in vitro*, la répression de Bcl-6 est nécessaire à la formation des cellules B mémoires (Kuo et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré un rôle de la stimulation par le CD40 dans la différenciation des cellules B du centre germinatif en cellule B mémoire, sur la base d'expériences *in vitro*. Des cellules B du centre germinatif mises en présence de fibroblastes présentant le CD154 (CD40L), ainsi que d'IL-2 et d'Il-10, acquièrent un phénotype de cellules B mémoires, alors que le

retrait du ligand de CD40 du système entraîne la différenciation des cellules en plasmablastes (Arpin et al., 1995).

2.1.3. Zoom sur le locus IgH et la région régulatrice située en 3' du locus

Les gènes des Ig sont regroupés en trois locus : IgH (chromosome 14q32), Igκ (chromosome 2p11) et Igλ (chromosome 22q11). Des éléments *cis*-régulateurs sur ces loci assurent la transcription et le contrôle des réarrangements de gènes. Ces différents événements sont ordonnés et liés aux stades de différenciation de la cellule B décrits précédemment. Dans notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au locus IgH et à la région régulatrice situées en 3' de ce locus.

2.1.3.1. Description du locus IgH

L'expression des gènes des régions variables et des régions constantes est régulée par des éléments *cis*-activateurs : des promoteurs, des activateurs et des régions d'attachements à la matrice, que nous allons décrire ici (cf **Figure 15**).

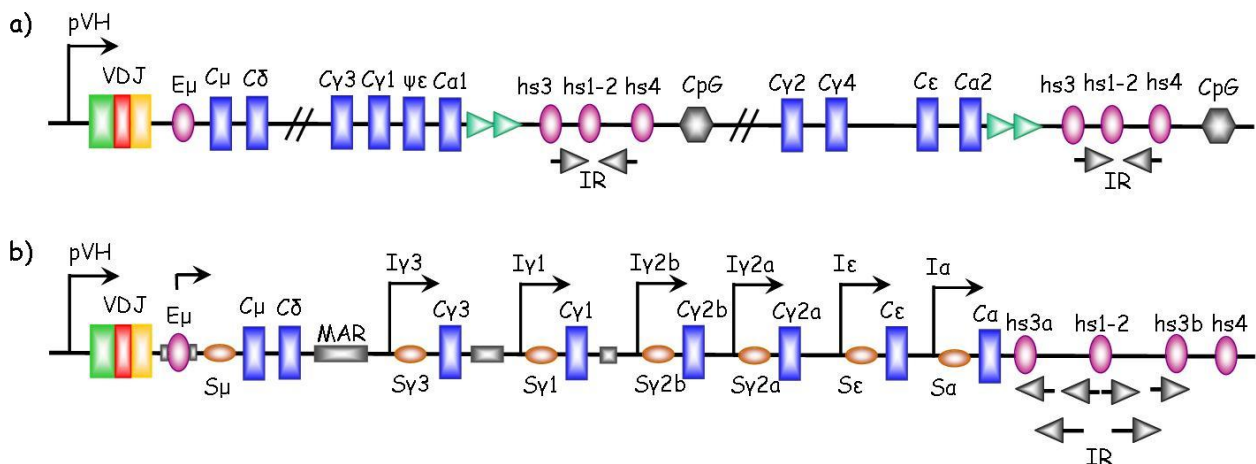


Figure 15 : Structure des loci IgH humain et murin.

Les gènes constants sont représentés par des rectangles bleus, les activateurs par des ellipses roses, et les régions répétées inversées par des flèches noires.

a) : Le locus IgH humain. Les régions en 3' des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ contiennent des activateurs, des séquences répétées de 20 pb (flèches vertes) et des régions riches en G+C (hexagones gris).

b) : Le locus murin. Les ellipses jaunes représentent les régions "switch" et les rectangles gris les régions d'ancrage à la matrice (MAR). D'après (Khamlichi et al., 2000).

✓ Les promoteurs : Les promoteurs des régions variables des gènes des chaînes lourdes des Ig sont situés en amont de chaque segment V et assurent un niveau basal de transcription. Leur

activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Ces promoteurs pV_H ont la particularité de posséder une séquence octamérique très conservée en amont : la *TATA box* (ATGCAAAT), alors qu'il s'agit de la séquence inversée dans les promoteurs des chaînes légères (ATTTGCAT) (Parslow et al., 1984). Des travaux de transfections stables ont montré que ce motif, nécessaire pour l'activité du promoteur, permettait son expression tissu-dépendante (Mason et al., 1985). De plus, l'insertion de ce motif en amont d'un promoteur non-fonctionnel dans le lymphocyte B lui permet de devenir hautement actif dans un modèle B. Ces études montrent que cet élément permet aux gènes d'Ig leur expression restreinte aux cellules B (Dreyfus et al., 1987). Ces séquences sont reconnues par les facteurs Oct. Il s'avère que Oct-1, ubiquitaire, et Oct-2, restreint à la lignée B, sont nécessaires à l'activité du promoteur, spécifiquement dans la lignée B (Pfisterer et al., 1994). D'après l'étude menée par Eaton et Calame en 1987, il apparaît qu'en plus de la région octamérique et du site d'initiation de la transcription, deux autres régions sont essentielles à une forte activité des promoteurs pV_H : l'heptamère CTAATGA et une région riche en pyrimidines (Eaton and Calame, 1987). Notons que certains promoteurs pV_H possèdent une boîte *TATA-like*, orientée de façon opposée, lui conférant un caractère bidirectionnel (Doyen et al., 1989). Enfin, des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque chaîne des régions constantes d'Ig, à l'exception de C δ . Ce sont les sites d'initiation de la transcription germinale.

✓ L'activateur intronique E_μ : L'activateur transcriptionnel E_μ a été le premier décrit au sein du locus IgH. Il est localisé dans l'intron séparant le dernier segment J_H et le gène C_μ (Banerji et al., 1983). De part et d'autres de E_μ se situent des régions d'ancrage à la matrice nucléaire (MARs, pour *Matrix Associated Region*). La localisation de E_μ en amont de la région S_μ le préserve des différents évènements de recombinaison ciblant le locus. E_μ régule positivement les réarrangements V(D)J et la transcription initiée à partir des multiples promoteurs du locus IgH (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993). E_μ fixe de nombreux facteurs dont Oct-1 et Oct-2. La région centrale de E_μ (ou "*core*") fixe les protéines activatrices de la famille E2A, dont la liaison peut être inhibée par les protéines Id, ainsi que le facteur PU.1. Les protéines ZEB réprimerait E_μ dans les cellules non-B (Ernst and Smale, 1995).

La délétion du "*core*" de E_μ chez des souris homozygotes a permis de montrer que cet activateur était requis dans la recombinaison des segments D vers J, que son absence diminuait mais ne bloquait pas la recombinaison de classe et enfin qu'il n'était pas indispensable au processus d'hypermutation somatique (Perlot et al., 2005). Ces résultats confirment le rôle central attribué à

$E\mu$ dans la régulation de l'accessibilité du locus IgH, mais suggère néanmoins la présence d'autres éléments régulateurs.

✓ Les MARs : Le rôle de ces régions reste encore incompris. Une étude a néanmoins proposé que ces régions fixeraient le facteur de transcription Bright (*B Cell Regulator of IgH Transcription*), activant $E\mu$ et permettant le remodelage de la chromatine, alors qu'elles avaient été précédemment définies comme des régulateurs négatifs dans les cellules non-B (Kaplan et al., 2001).

✓ Le promoteur activateur DQ52 : DQ52 (DHQ52 chez l'homme) est un promoteur activateur synergique de $E\mu$, caractérisé en 1994, il s'agit du segment D le plus en 3' du locus (Kottmann et al., 1994). La délétion de DQ52 n'affecte pas la transcription germinale, ni les réarrangements des segments de gènes IgH, alors que la délétion conjointe de DQ52 et $E\mu$ les diminue (Afshar et al., 2006). Ces résultats suggèrent, là encore, que $E\mu$ est un élément central mais qu'il existe d'autres éléments régulateurs au sein du locus d'IgH.

✓ La région régulatrice située en 3' : L'activateur transcriptionnel $E\mu$ a d'abord été considéré comme l'élément central de la régulation transcriptionnelle du locus IgH. Cependant, la description de lignées cellulaires B produisant un taux normal d'Ig alors qu'elles ont spontanément délété $E\mu$ a remis ce rôle en question (Klein et al., 1984; Aguilera et al., 1985; Zaller and Eckhardt, 1985). Il a par ailleurs été observé que certaines translocations de l'oncogène *c-myc* au locus IgH entraînant la disparition de $E\mu$, permettent une forte expression de l'oncogène (Neuberger and Calabi, 1983). C'est finalement à la suite de la caractérisation d'une lignée cellulaire murine présentant une large délétion (de 4 kb) de la région située immédiatement en 3' du gène $C\alpha$ et manifestant une diminution de la transcription, que cette région fut proposée comme candidate pouvant contenir des éléments cis-régulateurs (Gregor and Morrison, 1986).

En 1990, l'équipe de Neuberger a mis en évidence la présence d'un élément activateur fort, spécifique du lignage B, 25 kb en aval de $C\alpha$, chez le rat. Suite à cette observation, les auteurs ont suggéré que cet élément pourrait jouer un rôle dans l'activation du gène *c-myc* transloqué dans les cas d'immunocytome chez le rat, de plasmocytome chez la souris ou bien encore de lymphome de Burkitt chez l'homme (Pettersson et al., 1990). Son homologue chez la souris, 3' α E, se trouve 16 kb en 3' de $C\alpha$, et est orienté de manière opposée. Cependant, ils sont tous les deux flanqués de séquences répétées inversées et présentent 82% d'homologie (Dariavach et al., 1991). Un second élément activateur, nommé $C\alpha 3'$, a par la suite été mis en évidence 2 kb en aval de $C\alpha$ (Matthias and Baltimore, 1993). L'analyse de la région murine 3' α par la recherche de sites hypersensible à la

DNaseI a permis de superposer ces régions hypersensibles (hs) à des éléments décrits comme *cis*-activateurs. L'élément 3'αE a alors été confondu avec les sites hs1 et hs2, et deux autres activateurs, hs3 et hs4, ont été identifiés à 29 et 33 kb respectivement en 3' de Cα (Giannini et al., 1993; Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995). Par la suite, le séquençage de cette région a révélé une structure globalement palindromique, constituée des éléments C3'α, 3'αE et hs3, s'étendant sur plus de 20 kb, le plus grand jamais décrit chez les mammifères (Chauveau and Cogne, 1996). L'élément 3'αE, entouré de longues séquences en répétitions inversées, est le centre de ce palindrome et l'élément Cα3' se trouve être l'homologue inverse de l'élément hs3. Chez la souris, les éléments activateurs seront finalement dénommés (de 5' vers 3') **hs3a** (Cα3'), **hs1-2** (3'αE), **hs3b** (hs3) et **hs4**, dans un souci de clarté (Saleque et al., 1997). Enfin, trois autres sites ont été découverts en aval de hs4, à savoir hs5, hs6 et hs7, mais leur fonction n'est pas clairement élucidée. Ces éléments pourraient jouer le rôle d'isolateur de la chromatine (Garrett et al., 2005).

Chez l'homme, les gènes constants sont dupliqués en deux blocs, séparés par environ 35 kb (cf. **Figure 15**). La même année, trois équipes ont mis en évidence des éléments similaires aux activateurs murins. Ils sont au nombre de trois en aval de chaque gène α : **hs3** (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997), **hs1-2** (Chen and Birshstein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997) et **hs4** (Mills et al., 1997). Ces éléments, seront par la suite nommés dans ce manuscrit **Hhs3**, **Hhs1-2** et **Hhs4** (H pour *Human*). Ils sont organisés de la manière suivante : 5'-Hhs3-Hhs1-2-Hhs4 - 3'. Hhs1-2 est flanqué de régions répétées inversées. Même si aucune homologie de séquences n'est retrouvée entre ces régions flanquantes murines et humaines, une homologie d'architecture semble être maintenue dans les deux espèces, ainsi que chez plusieurs mammifères (Pinaud et al., 1997; Sepulveda et al., 2005).

De plus, on note chez l'homme un polymorphisme complexe pour Hhs1-2. D'une part, l'étude par Southern blot des régions situées en 3' des gènes α1 montre un polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) (Pinaud et al., 1997). Ce polymorphisme a été confirmé et détaillé par l'amplification et le clonage d'éléments Hhs1-2 multiples présentant un nombre variable de régions répétées en tandem (VNTR) (Denizot et al., 2001). En revanche, Hhs3 et Hhs4 ne sont pas polymorphes (Guglielmi et al., 2004). Enfin, en aval des activateurs Hhs4, des auteurs ont mis évidence la présence d'îlots de séquences riches en CpG, dont le rôle reste encore à éclaircir (Sadhu et al., 1997).

2.1.3.2. Activité transcriptionnelle de la LCR 3'IgH

L'activité transcriptionnelle de cette région régulatrice a été appréciée d'une part par des expériences de transfections dans des lignées cellulaires B correspondant à des stades définis, et d'autre part par des modèles transgéniques.

✓ Activité au cours du développement B : L'élément hs1-2, chez le rat et la souris, est actif aux stades B tardifs (Pettersson et al., 1990; Dariavach et al., 1991; Lieberson et al., 1991). Cependant, les résultats obtenus dans les lignées B matures apparaissent plus contrastés (Dariavach et al., 1991; Fulton and van Ness, 1994). Des études réalisées sur des souris transgéniques contenant un gène rapporteur sous la dépendance de hs1-2 murin montrent une forte expression dans les cellules B activées, mais la spécificité de cet élément pris isolément n'est pas complète puisqu'une expression du gène est constatée dans d'autres tissus (thymus, cœur et rein) (Arulampalam et al., 1994; Andersson et al., 1999). L'activité des éléments hs3 (a et b), appréciée par des expériences de transfection transitoire, est plus faible et restreinte aux stades B mature et plasmocytaire (Matthias and Baltimore, 1993; Madisen and Groudine, 1994). Enfin, hs4 est également un élément activateur assez faible, mais son activité est retrouvée tout au long du développement B (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

Les éléments du locus humain ont un profil d'expression similaire à celui observé pour les éléments murins. Leur activité a été appréciée par des expériences de transfections transitoires dans des lignées humaines (Chen and Birshstein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Cependant, il est à noter que leur étude est rendue plus complexe d'une part à cause de la duplication des gènes constants au sein du locus humain, et d'autre part par le polymorphisme de Hhs1-2 $\alpha 1$. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que les variants polymorphes de Hhs1-2 $\alpha 1$ possèdent des capacités variables à activer la transcription d'un gène rapporteur. Des expériences plaçant le gène rapporteur de la *luciférase* sous le contrôle d'un pV_H, lui-même sous la dépendance des différents allèles de Hhs1-2 $\alpha 1$ (Hhs1-2 $\alpha 1A$, Hhs1-2 $\alpha 1B$ et Hhs1-2 $\alpha 1C$) et de Hhs1-2 $\alpha 2$, ont démontré que plus l'allèle contenait de VNTR, plus sa capacité à activer un gène rapporteur était importante (Denizot et al., 2001).

De façon générale, ces profils d'expression corrélerent avec les profils de méthylation/déméthylation, relatant de l'accessibilité de la région, puisque la région 3'IgH est hyperméthylée au stade B précoce et se déméthyle au cours de l'ontogénie B (Giannini et al., 1993).

✓ Synergies entre les éléments activateurs 3' du locus IgH : La découverte d'éléments régulateurs multiples situés en 3' du locus IgH a incité la recherche de coopérations entre les éléments hs de cette région puis du locus entier. Dans un premier temps, l'équipe de Neuberger a transfecté une lignée plasmocytaire avec un vecteur contenant un gène μ réarrangé sous le contrôle d'un promoteur pV_H et de l'activateur E_μ , en présence ou non de hs1-2. : les résultats ont permis d'observer l'augmentation de la transcription d'un facteur deux (Dariavach et al., 1991). En utilisant la même approche, l'équipe de Mocikat a montré que la distance séparant E_μ de hs1-2 a une influence sur l'activation de la transcription (Mocikat et al., 1993; Mocikat et al., 1995).

Par la suite, l'identification des éléments hs3b et hs4 a permis d'étudier l'effet d'une combinaison des quatre hs sur la transcription du gène humain de l'hormone de croissance, mis sous la dépendance soit du promoteur de *c-myc*, soit de chaînes légères. Les auteurs ont avancé l'hypothèse que, dans une lignée de plasmocytome, les éléments pris individuellement activent modérément les promoteurs, alors qu'une forte activation de la transcription intervient lorsque ces éléments sont combinés, et plus particulièrement lorsqu'ils sont tous présents. Dans une lignée pré-B, hs1-2 et hs3 sont sans effet, même présents en copies multiples, alors que hs4 seul suffit à activer la transcription (Madisen and Groudine, 1994). Dans un système utilisant un promoteur pV_H , l'activité de hs1-2 est particulièrement augmentée dans des lignées B matures si l'élément est flanqué de deux copies inversées de hs3, mimant ainsi la disposition palindromique. Dans une lignée pré-B, la coopération n'est restaurée qu'en présence de hs4 (Chauveau et al., 1998). Des résultats similaires sont obtenus concernant les éléments humains, puisque l'élément Hhs1-2 voit son activité augmentée lorsqu'il est combiné avec Hhs3 et l'activité est maximale quand Hhs4 leur est associé (Pinaud et al., 1997; Hu et al., 2000).

Des expériences de coopération entre l'élément E_μ et l'intégralité de la région ont également été réalisées. En règle générale, les éléments pris individuellement, n'augmentent pas significativement l'activité de E_μ . La combinaison de plusieurs éléments devient un puissant co-activateur de E_μ , en particulier lorsque ces éléments sont disposés dans leur association palindromique (hs3a-hs1-2-hs3b); par ailleurs, la présence de hs4 amplifie d'autant plus le phénomène (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998).

Enfin, des études réalisées *in vivo* avec des vecteurs B-spécifiques, développés dans notre laboratoire, plaçant le gène de la GFP sous le contrôle d'un promoteur pV_H et de la région 3' dans son architecture palindromique endogène montrent là encore la synergie entre les différents éléments régulateurs chez la souris (Guglielmi et al., 2003).

✓ Les éléments activateurs en 3' du locus IgH forment une LCR : Une région de contrôle du locus (LCR pour *Locus Control Region*) est définie comme une séquence d'ADN capable, dans un système transgénique ou de transfection stable, d'activer en *cis* l'expression d'un transgène avec un taux transcriptionnel élevé dépendant du nombre de copies, indépendamment de son site d'intégration, tout en respectant la spécificité de lignage conférée par la combinaison promoteur-activateur. En général, les composants d'une LCR sont colocalisés avec des sites d'hypersensibilité à la DNaseI. Dans leurs travaux datant de 1994, Madisen et Groudine ont été les premiers à suggérer que les éléments 3' IgH constituaient une LCR, dans un modèle de plasmocyte transfecté avec le transgène *c-myc* sous le contrôle des quatre éléments 3' IgH. Les auteurs ont conclu que ces éléments confèrent une expression indépendante du site d'intégration (Madisen and Groudine, 1994). Une étude menée au laboratoire, générant des souris portant le transgène de la β -globine placé sous la dépendance d'un promoteur pV_H et des quatre éléments 3' IgH, a permis d'observer un fort niveau d'expression du transgène, indépendamment du site d'intégration et restreint aux cellules B de la rate, mais sans corrélation avec le nombre de copies du transgène. Ceci suggère donc que ces éléments agissent comme une LCR partielle (Chauveau et al., 1999).

Puisque chez l'homme, les régions 3' des gènes *Ca1* et *Ca2* contiennent les éléments Hhs3, Hhs1-2 et Hhs4, similaires à leurs homologues murins, l'hypothèse que ces éléments fonctionnent de manière similaire à une LCR partielle a été émise (Mills et al., 1997). Dans la suite de ce manuscrit, par souci de simplification, nous nommerons donc ces trois éléments (trois chez l'homme, quatre chez la souris): la LCR 3' IgH.

2.1.3.3. Protéines se fixant aux éléments régulateurs de la LCR 3' IgH

L'activité de la LCR 3' IgH est étroitement régulée au cours de l'ontogénie B. Cette région est la cible de nombreux facteurs de transcription, démontrés ou potentiels (cf. **Figure 16**). De nombreuses expériences prouvant la liaison et/ou le rôle de facteurs de transcription ont été conduites chez la souris (Khamlichi et al., 2000).

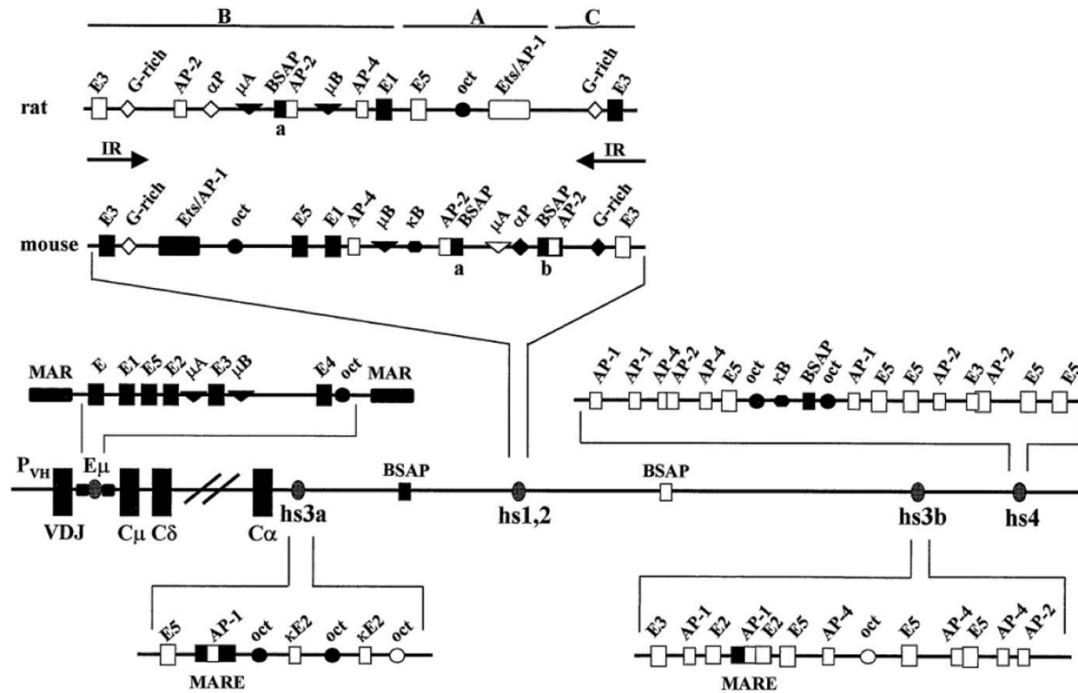


Figure 16 : Représentation schématique des sites de fixation pour des facteurs de transcription chez la souris.

Les sites pour lesquels la fixation a été démontrée sont en noirs, les sites potentiels sont en blanc. (Khamlichi et al., 2000).

Chez l'homme, le rôle des facteurs est beaucoup moins étudié. Néanmoins, sur la base d'homologie de séquences, des sites potentiels ont été proposés (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997).

✓ Protéines se fixant à hs1-2: Le "core" de l'élément Hhs1-2 contient une séquence homologue à 75% avec le "core" de hs1-2 murin (mhs1-2). Il semble présenter l'essentiel des motifs permettant la fixation de facteurs de transcription importants pour l'activité de Hhs1-2, tels que AP1, ETS et Oct. En amont du "core" est localisée la région répétée entre les deux duplications de Hhs1-2. La longueur de cette région varie selon les auteurs : elle est de 44 pb + 17 pb pour (Pinaud et al., 1997), de 53 pb pour (Chen and Birshtein, 1997) et de 59 pb pour (Mills et al., 1997). Cette région contient des sites de fixation pour les facteurs μ E1 et NF- κ B, ainsi qu'un motif riche en G+C (correspondant aux 17 pb décrites par (Pinaud et al., 1997)). Cette région pourrait être en partie responsable de la plus forte activité de Hhs1-2 α 2, comparée à Hhs1-2 α 1, observée par ces mêmes auteurs, du fait de la répétition de cette séquence.

Les observations suivantes ont été réalisées sur l'élément hs1-2 murin. Le site BSAP1, présent chez la souris, fixe le produit du gène *PAX5*, BSAP (pour revue, (Cobaleda et al., 2007)). Cette

protéine contrôle entre autre la prolifération des cellules B et la commutation de classe. Il s'avère que BSAP réprime hs1-2 aux stades B précoces (Neurath et al., 1994). Cette fonction répressive de BSAP est due à son interaction avec les protéines Oct-1 et Oct-2 (se fixant sur les sites Oct) et NF- κ B (Singh and Birshstein, 1996). Enfin, en 1997, il a été démontré qu'un site NFE, fixant des protéines de la famille Ets, est présent à proximité du site NF- κ B. La présence de ces deux sites suffit à induire une forte transcription, laissant penser que ces protéines entrent en synergie. Les sous-unités du facteur NF- κ B impliquées sont p50, c-Rel et p65 (Linderson et al., 1997). Une étude ultérieure a montré que p50 augmente l'activité de hs1-2 dans les cellules activées par du LPS et que c-Rel induit une meilleure activité dans les cellules B activées par CD40 (Zelazowski et al., 2000).

✓ Protéines se fixant à hs3 : Le "core" de l'élément Hhs3 est d'environ 200 pb et présente 62 % d'homologie avec les éléments mhs3a et mhs3b. D'après les homologies de séquences entre les deux éléments murins et les deux éléments humains (Hhs3 α 1 et Hhs3 α 2), des motifs μ E5, μ E2 et AP1 sont retrouvés. Par contre, l'octamère imparfait présent chez la souris, est absent chez l'homme (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997).

Chez la souris, les facteurs Oct-1 et Oct-2 se lient sur les octamères imparfaits (Matthias and Baltimore, 1993). Des protéines de la famille Maf, se fixant aux sites MARE des éléments mhs3b et mhs3a, s'hétérodimérisent avec la protéine Bach2, admise comme importante dans les processus de mutations somatiques et de recombinaison de classe, grâce à des souris déficientes pour Bach2 (Muto et al., 2004). Deux sites Oct, deux sites BSAP et deux sites NF- κ B ont également été découverts sur mhs3b. Les auteurs ont suggéré que le facteur YY1 active la réponse au LPS, en se liant à mhs3b (Greenbaum et al., 2004).

✓ Protéines se fixant à hs4 : Le "core" des éléments Hhs4 α 1 et Hhs4 α 2 est d'environ 150 pb. L'homologie entre les deux Hhs4 et mhs4 n'est que d'environ 40%, ceci étant dû en particulier à une délétion d'une quarantaine de base dans les éléments humains. Effectivement, le site BSAP présent chez la souris est absent chez l'homme. Si on ne tient pas compte de cette délétion, l'homologie est d'environ 70%. Un site pour NF- κ B et un site Oct sont présents chez l'homme et la souris. Néanmoins, il existe un site Oct supplémentaire chez la souris. Chez l'homme, il a été montré que le facteur YY1 était associé à Rel-B (membre de la famille NF- κ B) et la forte activité de Hhs4 dans des cellules B matures est due à la synergie entre les facteurs NF- κ B et les protéines liant les octamères (Oct-2) (Sepulveda et al., 2004). Enfin, des auteurs étudiant l'activité des différents

éléments humains sur le promoteur du gène *Bcl-2* ont mis en évidence deux sites Sp1, permettant une meilleure activation du promoteur de ce gène, en plus du site NF- κ B (Heckman et al., 2003).

D'une façon générale, la conservation des séquences permet de supposer (ou dans certains cas d'identifier) des motifs et donc des facteurs impliqués dans l'activité des éléments humains. Cependant, trop peu d'études concernant ces facteurs ont été conduites chez l'homme, comparativement aux éléments murins.

2.1.3.4. Fonctions de la LCR 3'IgH

De nombreux travaux, là encore majoritairement réalisés chez la souris avancement plusieurs fonctions pour la LCR 3'IgH, dont les plus importantes seraient des rôles dans les processus de remaniements de gènes (mutations somatiques et recombinaison de classes), mais également dans la l'expression du locus et la structure chromatinienne.

✓ L'hypermutation somatique : L'analyse de souris KO pour *mhs3b/mhs4* montrent que ces deux activateurs ne sont pas nécessaires ni pour l'assemblage des régions VDJ, ni pour l'induction de l'hypermutation somatique (Pinaud et al., 2001; Morvan et al., 2003). En 2001, il s'est avéré que ces deux éléments pouvaient induire l'hypermutation somatique, mais en association avec $E\mu$ et le promoteur pV_H (Terauchi et al., 2001).

✓ La transcription germinale et la commutation de classe : Le remplacement de *mhs1-2* ou de *mhs3a* par un cassette *pgk-néo^r* (promoteur *pgk* plus un gène de résistance à la néomycine), entraîne une diminution de la transcription germinale et de la commutation de classe (Cogne et al., 1994; Manis et al., 1998). Cependant, la délétion de cette cassette permet la restauration d'un phénotype sauvage (Manis et al., 1998). La délétion conjointe de *msh3b* et de *mhs4* altèrent la transcription germinale et la commutation de classe vers la majorité des isotopes (Pinaud et al., 2001). Ainsi, ces éléments distaux joueraient un rôle important sur ce phénomène. Cependant, la délétion unique de *msh4* et celle de *mhs3b*, réalisées récemment au laboratoire montrent que, pris séparément, ces éléments ne jouent pas de rôle sur la CSR (Bebin et al., 2009; Vincent-Fabert et al., 2009). Les auteurs suggèrent que l'absence de l'un ou l'autre des éléments ne suffit pas à détruire l'équilibre structurel.

✓ L'expression du locus : L'absence de *mhs3a* et *mhs1-2* suite à la délétion spontanée d'une région de 30 kb dans la lignée murine pré-B 71Z/3 atteste que ces deux éléments n'ont pas d'effets

sur l'expression de la chaîne μ (Saleque et al., 1999). A l'inverse, la délétion de *mhs4* seul ou la délétion conjointe des deux éléments distaux *mhs3b* et *mhs4*, induit une forte diminution de la transcription de la chaîne lourde μ avant l'activation par l'antigène (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009). L'élément *hs4*, le premier actif au cours du développement B, semble être impliqué dans l'expression de la chaîne lourde d'immunoglobuline dès les stades précoces. Enfin, la lignée LP1-2, délétée pour l'intégralité de la LCR 3'IgH présente une faible expression du gène α (Gregor and Morrison, 1986). Il en résulte que la région dans sa globalité régule la transcription.

✓ La structure chromatinienne : Madisen et Groudine ont avancée l'hypothèse que la région 3' IgH est une LCR (Madisen and Groudine, 1994). Par la suite, ces auteurs ont montré que les histones sont acétylés sur la totalité du vecteur contenant les éléments *hs1-2-hs3b-hs4*, combinaison permettant de conférer une forte expression de *c-Myc*. Ils ont ainsi proposé un rôle contributif de la LCR vis-à-vis du recrutement d'histones acétyl-transférases (HAT), permettant le maintien d'une région transcriptionnellement active (Madisen et al., 1998).

2.2. Les lymphoproliférations B, le virus d'Epstein-Barr et le lymphome de Burkitt

Dans cette dernière partie, nous allons aborder les lymphoproliférations B. Nous présenterons tout d'abord un bref descriptif des différents lymphomes et nous nous attacherons à comprendre quels sont les mécanismes moléculaires aboutissant à la genèse de ces cancers. Nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement au virus d'Epstein-Barr, dont la cible privilégiée est le lymphocyte B. Nous terminerons par étudier le lymphome de Burkitt, hémopathie caractérisée par la translocation de *c-myc*, et associée au virus d'Epstein-Barr dans certains cas.

2.2.1. Classification

Dans le monde occidental, environ 20 nouveaux cas de lymphomes sont diagnostiqués pour 100 000 personnes par an. Parmi eux, 90 % dérivent d'une cellule B. Les néoplasmes issus de cellules B (mais également d'une cellule T ou d'une cellule NK – *Natural Killer*) sont des tumeurs clonales et dérivent d'une cellule B (T ou NK) dans un état de différenciation donné.

2.2.1.1. Historique

D'une façon générale, les lymphomes tendent à être classés en fonction de leur équivalent non tumoral chaque fois que cela est possible. Cependant, tous les lymphomes ne répondent pas à cette

règle et dans ces cas, leurs équivalents non tumoraux n'ont pu être identifiés. Afin que la communauté scientifique s'entende sur la définition de chaque lymphome, un meeting organisé en 1991 à Londres par un groupe international de pathologistes (*International Lymphoma Study Group*), a abouti à un rapport sur la définition des lymphomes du manteau. Deux ans plus tard à Berlin, ce groupe a été en mesure de rédiger une liste des néoplasmes lymphoïdes, base d'une classification appelée la classification REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*), publiée en 1994 dans le journal *Blood* (Harris et al., 1994). Cette classification définit les différentes entités par rapport à leurs caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques et génétiques mais aussi à partir des cas cliniques et des traitements. Par la suite, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO – *World Health Organization*) en a repris les principes en l'étendant à l'ensemble des cancers hématologiques et publia en 2001 le premier livre de la classification des hémopathies malignes. Ce texte marqua ainsi le début d'une nouvelle ère dans laquelle les scientifiques et les cliniciens impliqués dans la recherche, le diagnostic des lymphomes et les soins aux patients, parlent un même langage. Cette classification a été mise à jour en 2008 (Swerdlow et al., 2008). Pour revue, (Jaffe et al., 2008).

2.2.1.2. L'origine cellulaire des lymphomes B

La plupart des lymphomes, à l'exception des lymphomes du manteau, et sans doute d'un type de leucémie lymphoïde chronique, dérivent d'une cellule B du centre germinatif ou post-centre germinatif. Les principaux types de lymphomes sont répertoriés dans la ***Figure 17***, qui relie le type de lymphome à sa contrepartie non-tumorale.

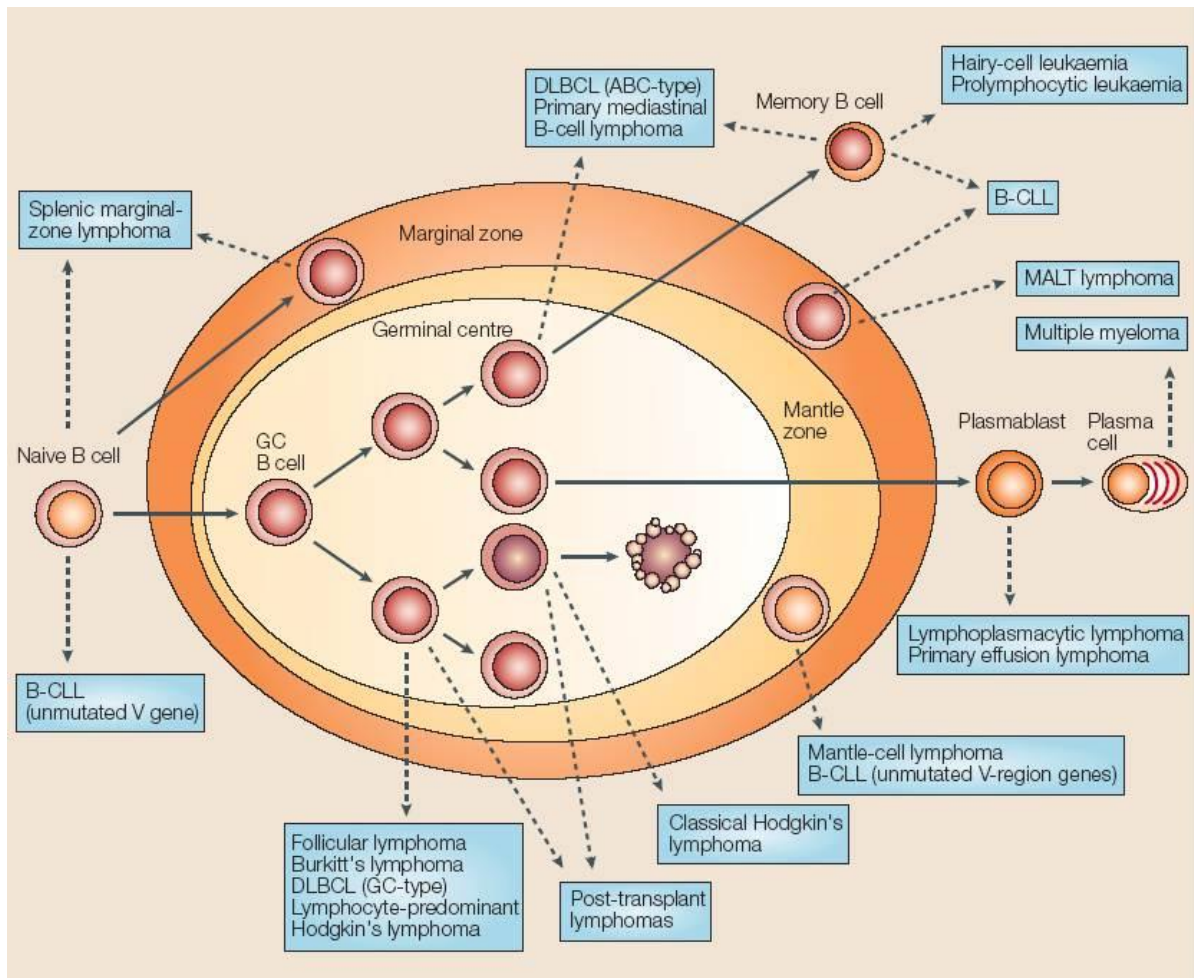


Figure 17 : Origine cellulaire des cellules B des différentes classes de lymphomes.

DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma ; ABC – in vitro-activated B cells ; B-CLL – B-cell chronic lymphocytic leukemia; MALT – Extranodal mucosa-associated lymphoid tissue; GC – germinal centre (Kuppers, 2005).

Rappelons que, de façon sans doute trop simpliste, une ancienne classification américaine dite "classification de travail", proposait de catégoriser les lymphomes B en lymphomes agressifs (ou de haut grade, correspondant aux lymphomes à grandes cellules) et lymphomes indolents (ou de bas grade, les lymphomes dits à petites cellules). Les lymphomes de haut grade comprennent les lymphomes diffus à grandes cellules, les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés et les lymphomes de Burkitt. Les lymphomes de bas grade correspondent à la leucémie lymphoïde chronique, aux lymphomes folliculaires, aux lymphomes du MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*), aux lymphomes de la zone marginale et aux lymphomes lymphoplasmocytaires. Le lymphome du manteau était classé à part, en grade "intermédiaire". Le lymphome hodgkinien, reconnu comme entité propre dès la première moitié du XIX^{ème} siècle n'a été rattaché au groupe des lymphomes B que dans le milieu des années 1990. La classification de travail est maintenant complètement obsolète, mais elle correspond à une réalité clinique de terrain. De plus, elle met en

exergue des processus de transformation assez différents puisque les mécanismes de protection contre l'apoptose sont prédominants pour les lymphomes B indolents, alors que les lymphomes agressifs sont caractérisés par la dérégulation de la prolifération cellulaire.

2.2.2. Mécanismes de la lymphomagenèse B

Poser la question de l'équivalent non tumoral revient à poser la question du passage de l'état normal à l'état cancéreux. Dans le paragraphe suivant, nous allons montrer des exemples de différents évènements géniques transformants pour la cellule B. Puis, nous verrons comment l'activation du BCR et le microenvironnement permettent à la cellule tumorale d'acquérir des signaux de survie et de prolifération (Kuppers, 2005).

2.2.2.1. Evènements géniques transformants

✓ Les évènements géniques impliquant la mécanique de la CSR et de la SHM : Les translocations chromosomiques réciproques impliquant un des trois loci des gènes d'Ig et un proto-oncogène sont des caractéristiques de nombreux types de lymphomes B (Kuppers and Dalla-Favera, 2001). Trois types de points de cassure se produisent dans les loci d'Ig. Dans le cas des translocations *BCL-2-IgH*, associées aux lymphomes folliculaires, les points de cassure sont directement adjacents à la région J_H ou se produisent lors de la jointure entre la région D_H et la région J_H. Ce type de translocation intervient lors des processus de recombinaison VDJ et serait donc restreint aux cellules B précurseurs de la moelle osseuse ; cependant de tels réarrangements peuvent parfois survenir dans le centre germinatif (Meffre et al., 1998). Dans un autre cas, les points de cassure sont rencontrés dans les régions VDJ réarrangées, ayant subi la plupart du temps des mutations somatiques, indiquant que la translocation a lieu au moment de la SHM. Le troisième type de translocation est caractérisé par la présence de points de cassure dans les régions "switch" des régions constantes, suggérant que cet évènement se produit lors de la CSR (Kuppers and Dalla-Favera, 2001). Le résultat d'une translocation chromosomique est la dérégulation transcriptionnelle de gènes qui régulent le développement B dans les centres germinatifs ou l'expression ectopique de gènes qui sont normalement éteints à un stade de développement de la cellule B mature. Les translocations impliquant *c-myc* dans le lymphome de Burkitt seront détaillées dans le paragraphe 2.2.4.

Le processus de SHM contribue à la lymphomagenèse en ciblant d'autres gènes que les gènes d'Ig. C'est par exemple le cas des gènes codant Bcl-6, PAX5, c-Myc, Fas, et Pim-1. On parle d'ASHM (*Aberrant SHM*). Ces mutations peuvent promouvoir le développement de lymphomes.

Ainsi, des mutations inactivant le gène *CD95* (codant Fas) sont retrouvées dans 20% des lymphomes post-GC, protégeant ainsi les cellules tumorales de l'induction de la mort par CD95-Ligand (Gronbaek et al., 1998). Ce processus peut également introduire des changements de nucléotides en 5' de la séquence (soit 2 kb en amont du site d'initiation de la transcription) de nombreux gènes ; dont *c-myc* et *Pim1*, perturbant leur régulation normale (Pasqualucci et al., 2001).

AID, enzyme essentielle aux mécanismes de SHM et de CSR, jouerait un rôle dans le développement de lymphomes B non-Hodgkiniens (B-NHL), en favorisant les translocations chromosomiques et les ASHM (Pasqualucci et al., 2008). En effet, des souris exprimant cette enzyme de façon continue et ubiquitaire développent des tumeurs d'origines cellulaires variées (Okazaki et al., 2003; Okazaki et al., 2007).

✓ Les autres évènements géniques : D'autres évènements transformants sont impliqués dans la lymphomagenèse, telles que des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs (p53 ou $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), des amplifications génomiques (*REL*), ou encore l'implication de virus (cf. **Tableau 3**). C'est le cas du virus d'Epstein-Barr (EBV, membre de la famille des *herpèsvirus*), qui est retrouvé dans la majorité des lymphomes de Burkitt endémiques, dans la plupart des lymphomes post-transplantations, des lymphomes associés au SIDA et des lymphomes diffus des séreuses, ainsi que dans 40% des cas de maladies de Hodgkin classique. Nous reviendrons ultérieurement sur l'implication de l'EBV dans la lymphomagenèse B (cf. 2.2.3.6). Mais d'ores et déjà, nous pouvons indiquer que l'oncogène majeur de l'EBV est la protéine LMP1, mimétique fonctionnel de CD40, activant constitutivement NF- κ B. A cet égard, deux publications récentes montrent la fréquence des mutations des gènes codant des régulateurs de NF- κ B comme les protéines CARD11, TRAF2, TRAF5, TNFRSF11A (RANK) et la protéine A20, dont la résultante est l'activation constitutive de NF- κ B (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009).

Lymphomes	Translocations chromosomiques	Mutations de gènes	Virus	Autres altérations
Lymphomes du manteau	<i>CCDN1-IgH</i>	<i>ATM</i>		Délétion 13q14
Leucémie lymphocytaire chronique		<i>ATM, p53</i>		Délétion 13q14
Lymphome folliculaire	<i>BCL-2-IgH</i>			
Lymphome diffus à grandes cellules	<i>BCL-6-variable, BCL-2-IgH, MYC-IgH ou MYC-IgL</i>	<i>CD95, ATM, P53, A20, CARD11, TRAF2/5, RANK.</i>		ASHM de nombreux oncogènes
Lymphome B primaire du médiastin		<i>SOCS1</i>		ASHM de nombreux oncogènes
Lymphome de Burkitt	<i>MYC-IgH ou MYC-IgL</i>	<i>p53, RB2</i>	EBV (endémique, sporadique)	
Lymphome après transplantations			EBV	
Lymphome de Hodgkin classique		<i>IκBA, IκBE, CD95</i>	EBV	Amplifications de <i>REL</i>
Lymphome de la zone marginale de la rate				Délétion 7q22-36
Lymphome du MALT	<i>API2-MALT1, BCL-10-IgH, MALT1-IgH, FOXP1-IgH.</i>	<i>CD95, A20</i>	Helicobacter pilory (lymphomes du MALT gastrique)	Mutations / Délétions de <i>A20</i>
Lymphome lymphoplasmacytoïde	<i>PAX5-IgH</i>			
Lymphome diffus des séreuses			HHV8, EBV	
Myélome multiple	<i>CCDN1-IgH, FGFR3-IgH, MAF-IgH.</i>	<i>CD95</i>		Altérations de <i>MYC</i> , mutations de <i>RAS</i> , délétions 13q14

Tableau 3 : Mécanismes moléculaires associés à différents types de lymphomes.

D'après (Kuppers, 2005; Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009).

2.2.2.2. Rôle du BCR dans la lymphomagenèse

Tout au long de son développement, la cellule B est sélectionnée par son BCR, tant pour être non auto-réactif que pour sa haute affinité à l'antigène, en faisant un élément principal pour sa survie. La réponse de la cellule B suite à sa liaison avec l'antigène transmet des signaux via le BCR à l'intérieur de la cellule. Ces signaux sont ensuite propagés par les kinases de la famille Src (Syk et Lyn). La phosphorylation des motifs ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) des molécules $I\alpha/I\beta$ (CD79a/CD79b) par Lyn permet le recrutement et l'activation de Syk. Syk

s'associe à des protéines adaptatrices et phosphoryle des protéines intermédiaires, comme BLNK (*B Cell Linker Protein*), PI3K (*Phosphatidylinositol 3 Kinase*) et PLC γ 2 (*Phospholipase C γ 2*), aboutissant à l'activation de facteurs impliqués dans la réponse cellulaire, comme Akt, ERK, JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*) et NF- κ B (Niuro and Clark, 2002).

Des études ont montré que la plupart des cellules tumorales expriment presque toujours un BCR. Ainsi, les signaux de survie engagés par le BCR sont possiblement fonctionnels, non seulement pour la cellule B normale, mais également pour la cellule B maligne.

Des études réalisées sur divers types de lymphomes ont montré que les cellules lymphomateuses pouvaient reconnaître et lier l'antigène, la stimulation (suite à la liaison avec l'antigène) contribuant ainsi à la survie et à la prolifération de la cellule. En effet, des analyses réalisées sur des cellules de patients atteints de lymphomes folliculaires ont montré que la plupart présentaient un BCR auto-réactif (Dighiero et al., 1991). De plus, durant leur expansion clonale, des mutations somatiques dont le profil indique une sélection par l'antigène sont observées (Bahler and Levy, 1992).

Cependant, si la plupart des cellules B de lymphomes expriment un BCR, il existe des exceptions. Dans la maladie de Hodgkin, la cellule tumorale (appelée cellule de Reed-Sternberg – RS), dérivent d'une cellule B ayant perdu la capacité d'exprimer une immunoglobuline de surface suite à l'apparition de mutations non fonctionnelles lors du processus de SHM. Dans 40% des cas, la cellule RS est infectée par l'EBV et exprime la protéine LMP2A. Cette protéine membranaire virale possède des motifs ITAM retrouvés sur les molécules Ig α et Ig β , associées au BCR et nécessaires à sa signalisation (Kraus et al., 2004). L'étude de souris transgéniques pour LMP2A dans des cellules B met en évidence que cette protéine induit l'activation continue des protéines kinases Syk et Lyn, détournant ainsi à son profit la voie de transduction du signal du BCR pour assurer la survie du lymphocyte B (Caldwell et al., 1998).

Ces différentes observations montrent la nécessité des voies de signalisation engagées par le BCR lors de la liaison à l'antigène, permettant la survie de la cellule. Ainsi, Syk a été rapporté comme constitutivement activée dans de nombreuses pathologies B (cas du lymphome folliculaire, du lymphome diffus à grandes cellules, de la leucémie lymphoïde chronique et du lymphome du manteau) et ce, en présence ou non du BCR (Carsetti et al., 2009).

2.2.2.3. Rôle du microenvironnement tumoral

Dans de nombreux lymphomes, le microenvironnement est important pour la survie et/ou la prolifération de la cellule tumorale. Dans le cas du lymphome folliculaire, la cellule tumorale est localisée dans les structures folliculaires où elle prolifère, et se trouve en étroite association avec les cellules *T-helper* et les cellules folliculaires dendritiques. Certains clones se situent dans des espaces interfolliculaires et ces cellules ont une activité proliférative moindre, prouvant que certaines cellules B de lymphomes ont besoin d'interactions cellulaires pour leur prolifération (Dogan et al., 1998). Pour appuyer cette idée, des travaux ont montré que les cellules du lymphome folliculaire ont besoin, pour leur prolifération *in vitro*, d'être en contact avec des cellules T CD4+ ou d'être cultivées en présence de cellules stromales et d'anti-CD40 (Umetsu et al., 1990; Johnson et al., 1993).

Les interactions CD40/CD40L sont importantes pour le lymphocyte B : elles permettent leur prolifération, leur différenciation, augmentent le niveau d'expression de molécules co-stimulatrices et interviennent dans la présentation de l'antigène. Ainsi, l'activation par le CD40 aboutit à la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) et des cellules NK (*Natural Killer*). La signalisation induite par CD40 mobilise les molécules TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*) et active principalement le complexe IKK (*I κ B Kinase*) et la kinase NIK (*NF- κ B Inducing Kinase*) dont la résultante est l'activation du facteur NF- κ B, à la fois par la voie canonique (complexes p65/p50) et par la voie non-canonique (complexes p52/RelB). L'activation via CD40 induit aussi l'activation de la PI3K, de PLC γ 2, des MAPK et des facteurs STAT (*Signal Transducer Activator of Transcription*) (Eliopoulos and Young, 2004).

La molécule CD40 est presque toujours exprimée sur les cellules de lymphomes B. De plus, une expression aberrante de CD40L, aboutissant à l'activation constitutive de CD40, est observée dans de nombreux cas de tumeurs, dont les cas de lymphomes non-hodgkiniens et de leucémies lymphoïdes chroniques. De ce fait, il a été suggéré un rôle du signalosome CD40/CD40L dans la lymphomagenèse. En effet, la production de CD40L par les cellules des lymphomes cités précédemment permet la prolifération autonome des cellules et les protège de l'apoptose. De plus, l'effet d'un anticorps anti-CD40L rompant la liaison CD40/CD40L *in vitro* induit la mort des cellules (Furman et al., 2000; Challa et al., 2002; Pham et al., 2002; Baxendale et al., 2005).

L'importance de la voie NF- κ B dans la genèse des lymphomes a été mise en évidence par deux publications récentes montrant la fréquence des mutations des gènes codant les régulateurs de

NF- κ B (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009). Ces données suggèrent l'acquisition d'une indépendance au microenvironnement par le biais de mutations acquises, activatrices de NF- κ B. Le modèle des lymphomes du MALT en est un autre exemple. Ces lymphomes gastriques sont en rapport avec une stimulation antigénique chronique par une bactérie : *Helicobacter pylori*. Le traitement par antibiotique éradiquant le germe aboutit à la guérison du lymphome dans 50% des cas. Il est admis que cette bactérie active les lymphocytes T qui par effet "by-stander" stimulent la prolifération des lymphocytes B, impliquant l'activation de NF- κ B. Les anomalies cytogénétiques (cf. **Tableau 3**) associées à ces lymphomes aboutissent à l'activation constitutive de NF- κ B et sont associées à la résistance au traitement par antibiotique.

Une autre étude récente mettant en exergue l'importance de l'activation constitutive de NF- κ B dans la lymphomagenèse a montré que l'activation constitutive de CD40 (sous la forme d'une protéine chimérique LMP1/CD40) permet un processus tumorigénique précoce, aboutissant au développement de lymphomes B, chez des souris transgéniques. Cet effet passe par l'activation de la voie non-canonique NF- κ B et de la voie des MAP Kinase (JNK et Erk) (Homig-Holzel et al., 2008).

2.2.3. Le virus d'Epstein-Barr

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été découvert par Epstein, Achong et Barr, dans une culture de cellules issues de lymphome de Burkitt (Epstein et al., 1964). Le virus est transmis par la salive et sa cible est le lymphocyte B. Dans le monde, plus de 90% de la population mondiale est infectée par l'EBV. La primo-infection a lieu le plus souvent durant l'enfance et est alors asymptomatique. Elle peut se produire plus tardivement chez l'adolescent ou le jeune adulte, et peut alors être symptomatique. La primo-infection par l'EBV induit une prolifération des lymphocytes B infectés par le virus. La réaction immune cellulaire T et NK cytotoxique contrôlant cette lymphoprolifération est silencieuse. Une réaction T/NK excessive peut donner lieu à la maladie bénigne associée à l'EBV, la mononucléose infectieuse, caractérisée par une angine avec des adénopathies généralisées. La résolution de la primo-infection, qu'elle soit asymptomatique ou non, aboutit à un équilibre hôte/virus, tel que le virus persiste dans l'organisme durant toute la vie de l'individu infecté. Les lymphocytes B mémoires sont le réservoir de l'EBV. Des réactivités virales se produisent à bas bruit tout au long de la vie. Cependant, l'apparition d'un déficit acquis de l'immunité cellulaire, a pour conséquence de rompre l'équilibre hôte/virus et de permettre l'expansion des lymphocytes B immortalisés par l'EBV. Le virus est directement immortalisant pour les lymphocytes B *in vitro*, est responsable de lymphoproliférations B chez les sujets

immunodéprimés et est associé à différents cancers comme la maladie de Hodgkin, les lymphomes T/NK, les lymphomes de Burkitt ou les carcinomes du rhinopharynx (Young and Rickinson, 2004).

2.2.3.1. Biologie de l'EBV

L'EBV est un virus à ADN double brin, appartenant à la famille des *gammaherpèsvirus*, dont le génome est de 172 kb. La principale cible du virus est le lymphocyte B. La protéine virale de l'enveloppe du virus se lie au récepteur CD21 présent à la surface des lymphocytes B et la glycoprotéine gp42 se lie au CMH de classe II. L'EBV peut aussi infecter les cellules T et les cellules épithéliales. Dans les particules virales, le génome est sous forme linéaire. Après l'infection de la cellule B, l'ADN du virus se circularise et persiste à l'état épisomal dans le noyau des cellules infectées. Episodiquement, le virus peut aussi entrer en cycle lytique et produire ainsi de nouveaux virions, causant la mort de la cellule infectée et le relargage de particules virales (cf. **Figure 18**).

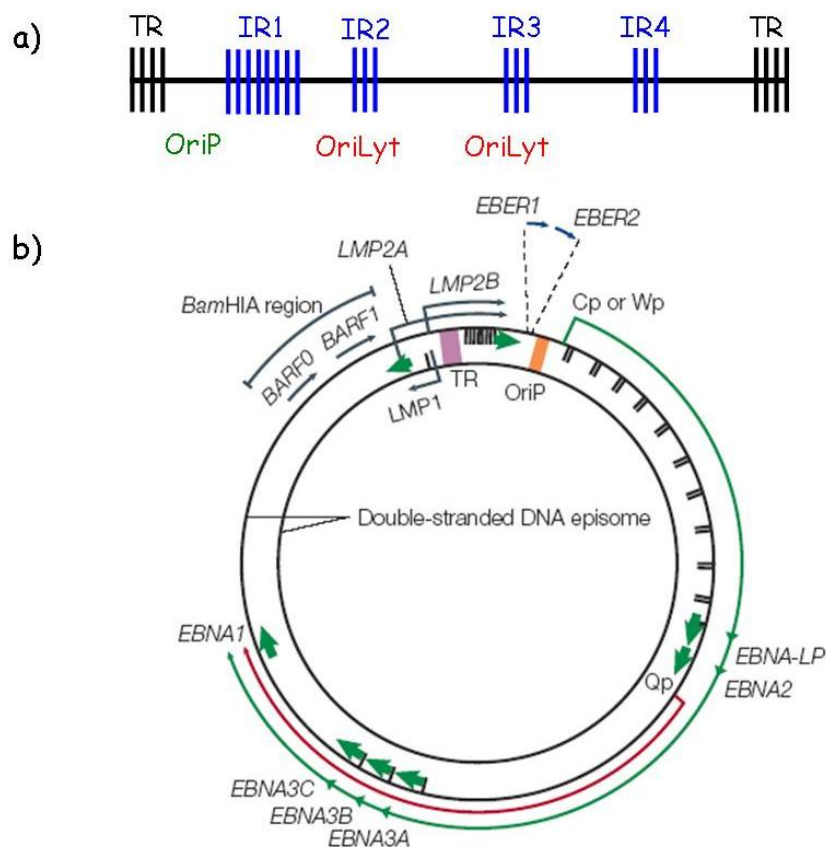


Figure 18 : Représentations schématiques du génome de l'EBV.

a) : Le génome sous sa forme linéaire. TR, Terminal Repeat ; IR, Internal Repeat ; OriP, Origine de Réplication Latente ; OriLyt, Origine de Réplication Lytique.

b) : L'épisome de l'EBV. Les flèches violettes représentent les régions codantes des protéines de latence. Les flèches orange représentent les ARN EBER. Cp, Wp et Qp sont les promoteurs.

D'après (Young and Rickinson, 2004).

Lors de l'infection latente, seuls quelques gènes viraux, appelés gènes de latence, sont transcrits : les protéines EBNA (*Epstein-Barr virus Nuclear Antigen*), les protéines LMP (*Latent Membrane Protein*), les ARN EBER (*EBV-Encoded small nonpolyadenylated RNAs*) et les BARTs (*BamHI A Rightward Transcripts*). On distingue quatre types de latence (0, I, II et III), en fonction de l'expression de ces gènes, qui sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV. Notons que l'immortalisation de cellules B *in vitro* conduit à l'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes, en latence III, appelées LCL (*Lymphoblastoid Cell Lines*) (cf. **Tableau 4**).

Latence	Gènes de l'EBV exprimés						Occurrences
	EBERs	EBNA1	LMP1	LMP2A	EBNA2	EBNA3 et EBNA-LP	
0	+	N.D.	-	+	-	-	Cellules B mémoires du sang périphérique
I	+	+	-	-	-	-	BL, PEL
II	+	+	+	+	-	-	HL
III	+	+	+	+	+	+	PTLD, LCLs

Tableau 4 : Gènes de l'EBV exprimés en fonction des programmes de latence.

N.D., Non Déterminés ; BL, Lymphome de Burkitt ; PEL, Primary effusion lymphoma ; HL, Lymphome de Hodgkin, PTLD, Lymphome post-transplantation ; LCL, Lignées cellulaires lymphoblastoïdes. D'après (Kuppers, 2003).

L'expression des gènes conduisant à la production de virions implique dans un premier temps des gènes très précoces (*BZLF1* codant la protéine ZEBRA et *BRLF1* codant le transactivateur Rta), puis des gènes précoces, et enfin des gènes tardifs permettant la formation de la capsid virale.

2.2.3.2. Les antigènes nucléaires codés par l'EBV (EBNAs)

Les cellules B infectées par l'EBV expriment un groupe de protéines nucléaires qui influencent la transcription virale et la transcription cellulaire.

✓ **EBNA1** : Cet antigène nucléaire est exprimé par toutes les cellules infectées par le virus. Son rôle est d'assurer le maintien et la réplication de l'épisome, en se fixant au niveau de l'origine de réplication latente OriP (Kieff and Rickinson, 2001). Bien qu'EBNA1 soit nécessaire au maintien de l'épisome, il apparaît qu'il n'est pas indispensable à la transformation, puisque l'équipe de Schepers a réussi à établir une LCL avec une souche déficiente pour EBNA1 (Humme et al., 2003). Par contre, une implication plus directe dans l'oncogénèse est sa possible contribution dans

la survie des cellules de lymphome de Burkitt *in vitro*, puisque son inhibition induit l'apoptose de ces cellules tumorales (Kennedy et al., 2003).

✓ EBNA2 : Le rôle crucial d'EBNA2 dans la transformation cellulaire a été mis en évidence grâce à la souche P3HR-1, exposant des délétions pour EBNA2 et une partie de EBNA-LP. Cette souche est incapable d'immortaliser des lymphocytes B *in vitro*. La restauration du gène codant EBNA2 au sein de cette souche a montré son importance dans la transformation cellulaire et a permis d'identifier les domaines fonctionnels de cette protéine (Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989). Dans sa partie carboxy-terminale, EBNA2 comprend quatre régions très conservées : une région d'interaction avec le facteur CBF1/RBP-Jκ, une région riche en résidus Arginine-Glycine, un Domaine de Transactivation TAD et une Séquence de Localisation Nucléaire (NLS). Ces régions sont nécessaires à la localisation nucléaire et à l'interaction d'EBNA2 avec l'ADN (Cohen et al., 1989; Cohen et al., 1991). EBNA2 est un puissant transactivateur de gènes viraux, comme LMP1 et LMP2A, mais aussi de gènes cellulaires, comme *c-myc* et *CD23* (Wang et al., 1987; Kaiser et al., 1999).

EBNA2 se fixe à l'ADN par l'intermédiaire de CBF1/RBP-Jκ (Grossman et al., 1994; Hsieh and Hayward, 1995), protéine effectrice de la voie Notch, voie essentielle dans de nombreux processus cellulaires tels que l'embryogénèse ou la différenciation musculaire (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001). Par son mode d'action, EBNA2 est considérée comme mimétique de la voie Notch. En l'absence d'EBNA2 ou de Notch, RBP-Jκ est un répresseur transcriptionnel. La fixation d'EBNA2 ou de Notch sur le domaine répresseur de RBP-Jκ lève la répression transcriptionnelle (cf. **Figure 19**). De plus, EBNA2 active la transcription en recrutant des complexes d'histones acétyltransférases (PCAF, CBP/p300) (Wang et al., 2000). Associée à EBNA2, EBNA-Lp joue un rôle de coactivateur, alors que les protéines EBNA3 modulent négativement EBNA2 (Young and Rickinson, 2004).

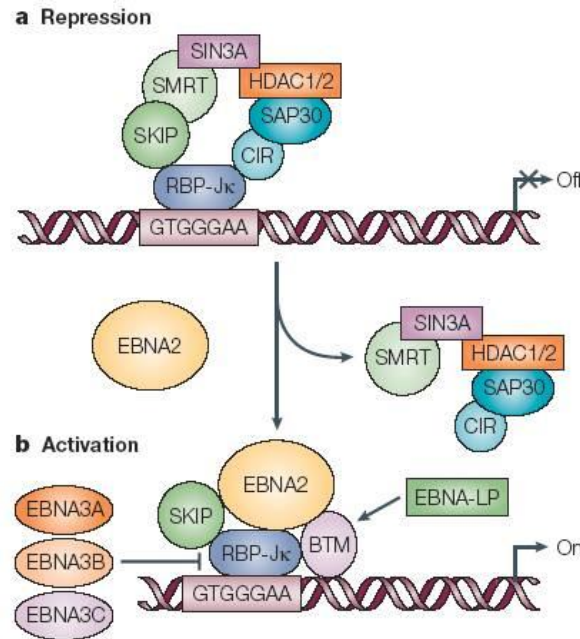


Figure 19 : Rôle des protéines EBNA dans la transcription.

a) : Le facteur RBP-J κ réprime la transcription en interagissant avec un complexe multiprotéique SMRT-HDAC.

b) : L'interaction d'EBNA2 avec RBP-J κ lève la répression transcriptionnelle. De plus, EBNA2 recrute la machinerie basale nécessaire à la transcription. EBNA-Lp coopère avec EBNA2 pour lever la répression. Les protéines EBNA3s interagissent avec RBP-J κ et entrent ainsi en compétition avec EBNA2, à la fois en terme de liaison et d'activation. BTM, Basal Transcription Machinery; CIR, CBF1 (RBP-J κ)-interacting corepressor; SAP30, SIN3A-associated protein; SMRT, Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormons; HDAC, Histone Deacetylase; SKIP, SKI-interacting protein.

(Young and Rickinson, 2004).

✓ EBNA3s : Les protéines EBNA3A (ou EBNA3), EBNA3B (ou EBNA4) et EBNA3C (ou EBNA6) sont des protéines nucléaires qui se fixent, comme EBNA2, sur RBP-J κ , et régulent négativement la transactivation des gènes par EBNA2 (cf. **Figure 19**). EBNA3A et EBNA3C sont essentielles à la transformation des cellules B *in vitro* (Tomkinson et al., 1993). EBNA3C est capable d'interagir avec des facteurs qui modulent la transcription et peut aussi influencer la progression dans le cycle cellulaire (Radkov et al., 1999). Ainsi, EBNA3C régule les voies modulées par pRB et induit l'accumulation de p27^{Kip1} (Parker et al., 1996; Parker et al., 2000). Récemment, il a été mis en évidence qu'EBNA3C peut interagir et stabiliser c-Myc en recrutant son co-activateur Skp2, augmentant ainsi la transcription des gènes cibles de c-Myc (Bajaj et al., 2008).

✓ EBNA-LP : EBNA-LP (ou EBNA5) joue un rôle important dans l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Mannick et al., 1991). EBNA-LP participe à l'expression des protéines membranaires de latence, via EBNA2 (Harada and Kieff, 1997). EBNA-LP peut se fixer aux

protéines pRB, p53 et p14^{ARF}, suggérant son implication dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Szekely et al., 1993; Kashuba et al., 2003).

2.2.3.3. Les protéines de latence (LMPs)

✓ La protéine LMP1 : LMP1 est considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV et est indispensable à la transformation des cellules B *in vitro* (Eliopoulos and Young, 2001). LMP1 se comporte comme un homologue fonctionnel de CD40 (membre de la "super famille" des récepteurs au TNF α) et peut partiellement se substituer à CD40 *in vivo*, en fournissant à la cellule B des signaux de prolifération et de différenciation (Uchida et al., 1999). Cette oncoprotéine est constitutivement activée et active à son tour de nombreuses voies de signalisation, indépendamment de la liaison avec un ligand, entraînant l'expression d'un grand nombre de gènes codant des protéines anti-apoptotiques mais aussi des cytokines, des molécules d'adhésion ou des antigènes d'activation. (Mosialos et al., 1995; Gires et al., 1997; Eliopoulos and Young, 2001).

LMP1 est une protéine de 63 kDa, pouvant être subdivisée en trois domaines : un domaine amino-terminal, un domaine transmembranaire composé de six boucles hydrophobes et un domaine carboxy-terminal composé des régions CTAR1 et CTAR2 (*C-Terminal Activation Regions 1 et 2*).

Les domaines CTAR ont été identifiés par leur capacité à activer les deux voies de signalisation NF- κ B (cf. **Figure 20**). NF- κ B se lie à l'ADN sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère composés de deux des cinq sous-unités décrites : RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) et NF- κ B2 (p52/p100). Deux principales voies d'activation sont décrites : la voie canonique (ou voie classique) et la voie non-canonique (ou voie alternative). Dans le cas de la voie canonique, les dimères p50/RelA sont retenus dans le cytoplasme par I κ B. La phosphorylation de I κ B par les kinases de la famille IKK (*I κ B Kinase*) résulte en la dégradation d'I κ B par le protéasome et la translocation nucléaire des complexes p50/RelA. Concernant la voie non-canonique, la kinase NIK (*NF- κ B-Inducing Kinase*) phosphoryle et active le complexe IKK qui à son tour phosphoryle deux résidus sérine de p100, aboutissant au clivage de p100 et à la libération du complexe p52/RelB. La signalisation induite par LMP1 entraîne l'interaction des facteurs TRAF (*TNFR-associated factors*) directement avec son domaine CTAR1 ou indirectement avec son domaine CTAR2, via une interaction avec le domaine de mort (*death domain*) de la protéine TRADD (Eliopoulos and Young, 2001). Ces protéines adaptatrices recrutent à leur tour des complexes multiprotéiques contenant les kinases NIK et IKK, résultant au final en l'activation à la

fois des voies canonique (hétérodimères p50-p65) et non-canonique (hétérodimères p52-RelB) de NF- κ B (Eliopoulos et al., 2003).

D'autres voies peuvent être activées par LMP1 (cf. **Figure 20**) : la voie des MAP Kinase (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), dont font partie les voies p38, JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), et la voie PI3Kinase (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) (Eliopoulos and Young, 2001).

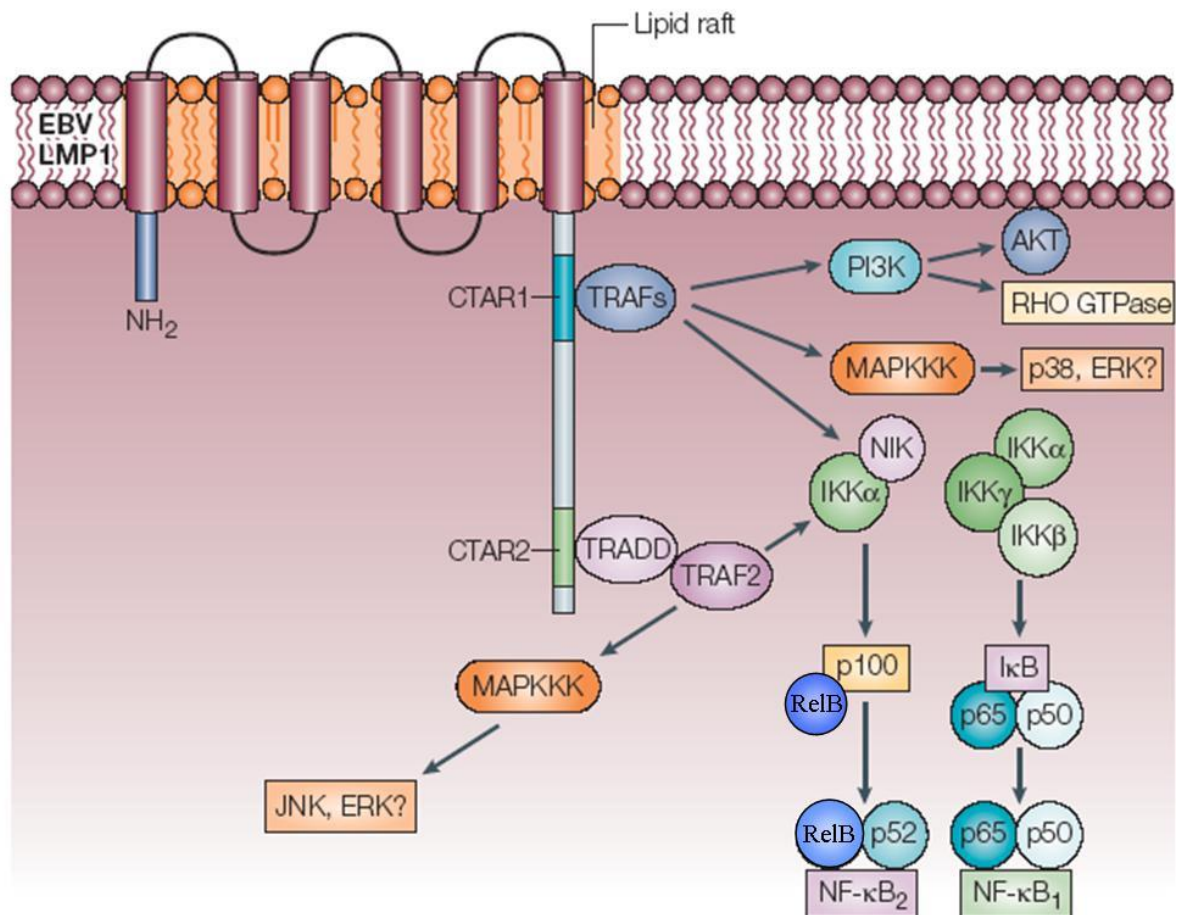


Figure 20 : Structure et fonctions de LMP1.

Représentation schématique des différentes voies de signalisation pouvant être induite par LMP1 : voie NF- κ B (canonique et non canonique), voie des MAPK (p38, JNK et ERK) et voie des PI3K. D'après (Young and Rickinson, 2004).

LMP1 induit l'expression d'antigènes d'activation à la surface de la cellule B, tels que CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), CD80 et CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B) (Wang et al., 1990; Kieff, 1996). LMP1 est impliquée dans la surexpression de molécules d'adhésion (LFA1/CD11, LFA3/CD58 et ICAM1/CD54) et de protéines anti-apoptotiques, (A20 et BCL2) (Wang et al., 1990; Kieff, 1996; Eliopoulos et al., 1997; Eliopoulos et al., 1999; Pai and

Khanna, 2001). Elle induit également l'expression d'interleukines (Il-10, Il-6, Il-8, TNF- α) et de chimiokines. Ajoutons que LMP1 peut activer le cycle cellulaire (Brennan et al., 2002).

Cependant, lorsqu'elle est fortement exprimée, LMP1 présente un effet cytotoxique (Hammerschmidt et al., 1989). Elle est impliquée dans le processus d'apoptose, en permettant la surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas/CD95. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'expression de CD95 induite par LMP1 sensibilisait les cellules à la réponse T cytotoxique (Le Clorenec et al., 2006). Enfin, la surexpression forcée de LMP1 est cytotoxique par auto-agrégation du récepteur Fas (Le Clorenec et al., 2008). Ainsi, le concept d'oncogène ambivalent a été formulé, puisque suivant son niveau d'expression, LMP1 favoriserait la survie de la cellule (faibles niveaux) ou l'apoptose (forts niveaux).

✓ Les protéines LMP2s : Les protéines LMP2A et LMP2B ne sont pas nécessaires à l'immortalisation des cellules B *in vitro* (Longnecker et al., 1993). Par contre, *in vivo*, LMP2A semble jouer un rôle dans le maintien du virus à l'état latent (Fukuda and Longnecker, 2005). En outre, il a été montré que l'expression de LMP2A dans des cellules B de souris transgéniques leur permet de contourner le développement B normal, permettant à des cellules n'exprimant pas d'Ig de coloniser les organes lymphoïdes secondaires. Ceci indique que LMP2A peut permettre la prolifération et la survie de la cellule B en l'absence d'une signalisation du BCR (Caldwell et al., 1998). En effet, la protéine LMP2A possède un motif ITAM lui permettant d'interagir avec les protéines kinases de la famille Src (Lyn et Syk) de la signalisation du BCR (Burkhardt et al., 1992). Pour finir, LMP2A induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la suppression de l'immunité cellulaire.

2.2.3.4. Les autres transcrits latents de l'EBV

Les ARN EBERs 1 et 2 (petits ARNs non-polyadénylés et non-codants), sont exprimés dans toutes les latences et ne sont pas essentiels à la transformation des cellules B *in vitro* (Kieff and Rickinson, 2001). Ces ARN joueraient un rôle dans la persistance du virus chez son hôte et contribueraient à la malignité du lymphome de Burkitt (Takada and Nanbo, 2001).

Les transcrits BARTs, codés par la région BAMHI du génome de l'EBV ont été mis en évidence dans des coupes de tissus de NPC (carcinome du rhinopharynx) puis par la suite dans de nombreuses pathologies associées à l'EBV. Un transcrit, généré à partir de cette même région BAMHI, est *BARF1*, qui aurait, dans certains cas des propriétés oncogéniques (Young and Rickinson, 2004). En 2004, les premiers microARN de l'EBV ont été mis en évidence au sein des

introns de la région BART. Leur rôle reste à élucider mais ils pourraient réguler l'immortalisation par le virus (Pfeffer et al., 2004).

2.2.3.5. Contrôle de l'infection par le système immunitaire

Lors de l'infection aiguë, une réponse cytotoxique non spécifique s'opère mettant en jeu les cellules NK et des anticorps neutralisants. Une réponse spécifique est initiée dans un deuxième temps. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent des antigènes provenant des protéines de latence et des protéines du cycle lytique. Les cellules T CD4⁺, qui ne subissent pas d'expansion lors de la phase aiguë de la mononucléose infectieuse, ne reconnaissent que certains antigènes du cycle lytique. En parallèle, une réponse humorale se met en place, avec production d'anticorps anti-VCA (protéine de capsid) et anti-EBNA (Hislop et al., 2007).

La mise en place d'une réponse mémoire implique des changements de marqueurs de différenciation et de migration des cellules T. Ces différences phénotypiques observées entre les populations mémoires, particulièrement marquées lors de la phase post-infectieuse, se retrouvent dans les populations sanguines d'individus porteurs sains, contrôlant l'infection asymptomatique (Hislop et al., 2007).

La forte prévalence de l'EBV chez les sujets immunocompétents suggère que le virus a développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire. De fait, le compartiment réservoir des lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV est quasiment invisible au système immunitaire puisque l'EBV y est en latence 0 dans les cellules quiescentes, n'exprimant aucune protéine, et en latence I dans les cellules en cycle, n'exprimant que EBNA1, et cela de façon transitoire.

Dans le cas de pathologies associées à l'EBV, LMP1 est hautement dérégulée et devient abondante dans la cellule tumorale, promouvant alors la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la progression tumorale. Cette protéine module, par différents mécanismes, la réponse immunitaire de l'hôte, notamment par la sécrétion de cytokines, de chimiokines ou encore d'exosomes (cf. **Figure 21**). Pour revue, (Middeldorp and Pegtel, 2008; Munz and Moormann, 2008). Dans le même temps, il a été montré qu'il existe une pression de sélection sur les protéines EBNA3 et LMP2A pour la conservation des épitopes les plus immunogènes pour la réponse T cytotoxique (Khanna et al., 1997). Ceci témoigne de l'importance de l'équilibre hôte-virus dans la biologie de l'EBV, en perpétuation au travers des âges.

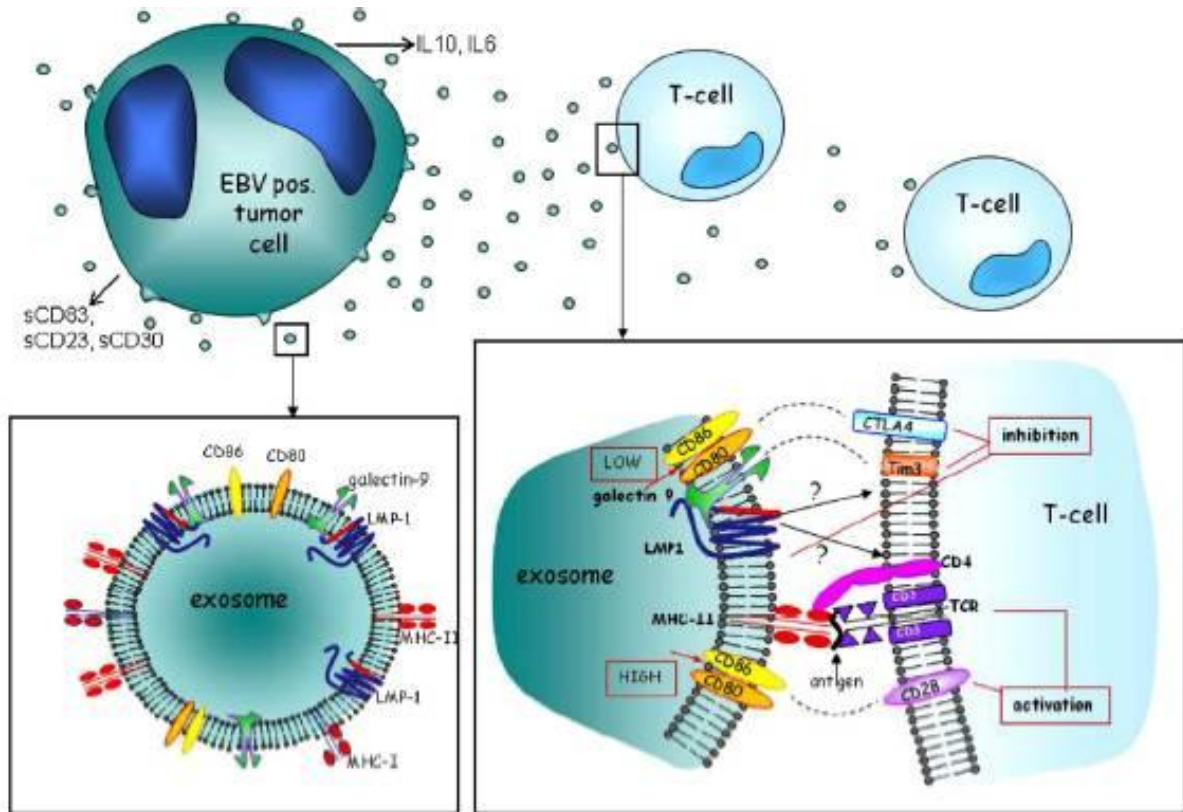


Figure 21 : Les effets immunomodulateurs de LMP1.

LMP1 peut influencer la sécrétion de cytokines ou de chimiokines ou de récepteurs immunomodulateurs. Il peut affecter le taux de renouvellement de protéines et peut immunomoduler la sécrétion d'exosomes. Ces exosomes LMP1-positifs peuvent alors entrer en contact avec le TCR via le CMH et des récepteurs de co-interaction, permettant la fusion entre l'exosome et la cellule T. LMP1 peut ainsi perturber la signalisation de la cellule T, aboutissant par exemple à l'induction de l'anergie. (Middeldorp and Pegtel, 2008).

2.2.3.6. Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse B

Les principaux lymphomes B associés à l'EBV sont le lymphome de Burkitt (BL, *Burkitt Lymphoma*), la maladie de Hodgkin (HL, *Hodgkin Lymphoma*), les lymphomes post-transplantation (PTLD), les lymphomes associés au SIDA et les lymphomes du sujet âgé. Le grand nombre de cas de HL et de BL sporadiques pourrait laisser penser que l'EBV a un rôle mineur dans la genèse de ces lymphomes. Cependant, la forte fréquence de cas positifs (40% pour le HL dans le monde occidental, et de 20 à 30% pour le BL), comparé à la faible fréquence de cellules B EBV+ chez le sujet immunocompétent (moins de 1 pour 10^6 cellules B), ainsi que la présence du virus dans toutes les cellules tumorales (et donc de l'infection par l'EBV de la cellule souche du clone impliqué), sont de très forts arguments suggérant l'implication de l'EBV dans la transformation de cellules B. Il est à noter cependant que l'EBV a pu être présent au début puis perdu par la cellule tumorale. Certains cas de HL EBER-négatifs ont encore des fragments d'ADN de l'EBV (Gan et al., 2002). Il

en est de même pour certains cas de BL, qui n'expriment pas les gènes de l'EBV mais au sein desquels on retrouve des fragments d'ADN viral intégrés dans leur génome (Razzouk et al., 1996). Notons que dans les cas de lymphomes EBV-négatifs, le rôle de l'EBV est remplacé par d'autres altérations génétiques. Ainsi, dans certains cas de HL, des mutations somatiques de l'inhibiteur de NF- κ B, I- κ B α , ou l'amplification du gène *REL* ont été détectées.

✓ Cas du lymphome de Burkitt : La translocation de *c-myc* se passe probablement dans une cellule déjà infectée par l'EBV dans le centre germinatif (Thorley-Lawson and Allday, 2008). Seuls les ARN EBER et EBNA1 sont exprimés (latence I). La cellule présente un profil centroblaste (BCL-6+, CD77+ et une activité de SHM), même si elle est localisée hors des follicules.

✓ Cas du lymphome de Hodgkin : Les cellules de Reed-Sternberg (RS) exposent souvent des mutations dans les régions V non fonctionnelles et n'expriment pas de BCR. Alors que ce type de cellules est normalement éliminé par apoptose dans le centre germinatif, la cellule de RS aurait échappé à l'apoptose suite à un ou plusieurs évènements transformants. Dans le cas de HL EBV+, ce rôle pourrait être joué par l'EBV, via l'expression des protéines LMP1 et LMP2 qui miment respectivement le CD40 et le BCR délivrant ainsi des signaux de survie.

✓ Cas des lymphomes post-transplantation : L'origine cellulaire de la tumeur dans ce type de lymphome est hétérogène. L'analyse des mutations dans les gènes d'Ig de 50 PTLD a montré qu'environ 75% des PTLD présentent des mutations, montrant que les cellules dérivent du centre germinatif (Capello et al., 2006). Ces lymphomes expriment le plus souvent tous les gènes de latence de l'EBV (latence III).

Ainsi, selon le type de lymphomes, la stratégie employée par le virus est différente, depuis l'infection jusqu'à l'expression des gènes de latence.

2.2.4. Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (BL) est un lymphome non-hodgkinien, décrit en 1958 par Denis Burkitt. La signature de cette maladie est la surexpression de l'oncogène *c-myc* du fait de sa translocation dans un des loci des gènes des Ig. De plus, dans certains cas, cette maladie est associée à l'EBV. Dans ce paragraphe, nous allons présenter ce lymphome d'un point de vue clinique, morphologique et génétique. Puis, nous essaierons de comprendre les rôles de c-Myc et de l'EBV dans cette pathologie.

2.2.4.1. Présentation clinique, morphologique et immunophénotypique

Trois variants cliniques ont été décrits : une forme sporadique, une forme endémique et une forme associée à une immunodéficience liée à l'infection par le VIH en général. La forme endémique est observée en Afrique équatoriale, chez des enfants âgés de 4 à 7 ans, et implique la mâchoire, les reins, les ovaires et la poitrine. L'adjectif endémique a été employé du fait de la forte incidence dans cette même zone géographique de la malaria (zone d'endémie palustre). Dans les zones caucasiennes, la plupart des patients présentent des tumeurs abdominales, mais aucune répartition géographique ou climatique particulière n'étant observée, ce variant a été nommé BL sporadique. Les symptômes présentés par les patients adultes atteints de BL sporadiques ou de BL associés au VIH sont des douleurs abdominales, des vomissements, une obstruction intestinale, pouvant mimer une appendicite aigue (Blum et al., 2004).

Le BL est un lymphome monotone de cellules B de tailles moyennes. Un aspect de ciel étoilé est décrit en raison des nombreux macrophages infiltrant la tumeur contenant des corps apoptotiques. Les cellules du BL sont IgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD10+ et CD79a+, CD38+ et CD5-, CD23- et TdT-. Le fait que ces cellules soient CD10+, Bcl-6+ suggère qu'elles dérivent du centre germinatif, ce qui est confirmé par l'analyse des séquences des régions variables des gènes d'Ig, présentant des mutations somatiques (Blum et al., 2004).

2.2.4.2. Profil génétique du BL

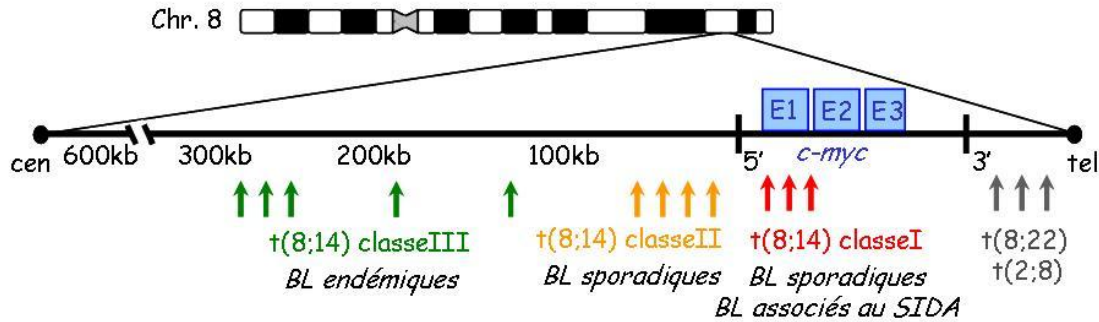
Le BL est caractérisé par la translocation du gène *c-myc*. Dans 80% des cas, *c-myc* est transloqué dans le locus IgH (t (8 ; 14)) et dans 20 % des cas dans le locus IgL, de la chaîne κ (t (2 ; 8)) ou de la chaîne λ (t (8 ; 22)).

Les points de cassure dans les BL sont définis en trois classes selon leur localisation par rapport au gène *c-myc*. Pour la classe I, le point de cassure intervient dans le gène *c-myc*, soit dans l'exon 1, soit dans le premier intron, la région codante reste intacte. Pour la classe II, le point de cassure est situé quelques kb en 5' de l'exon 1. Pour ces deux classes, le point de cassure sur le locus IgH intervient dans les régions S μ et elles sont associées aux BL sporadiques et aux BL associés au SIDA. Enfin, pour la classe III, le point de cassure sur le chromosome 8 a lieu au moins 100 kb en amont du gène *c-myc* et se produit dans les régions VDJ sur le locus IgH. La classe III est associée aux BL endémiques (cf. **Figure 22**).

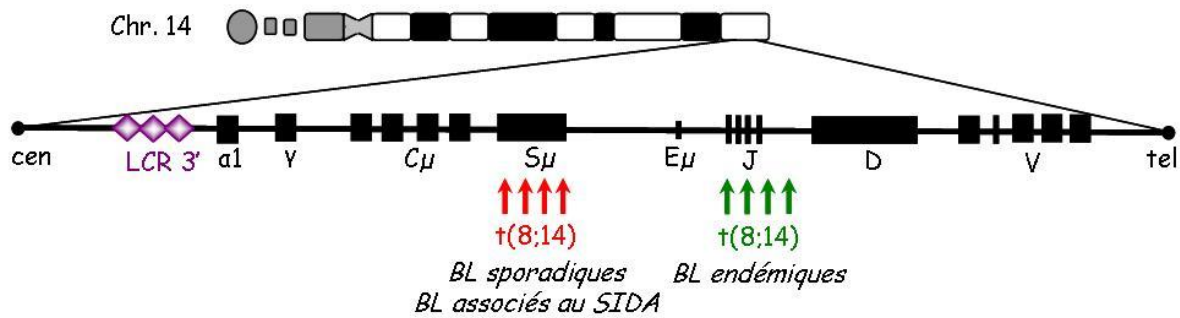
Deux types de réarrangements sont obtenus. Dans le cas de BL endémiques, les trois exons du gène *c-myc* ainsi que ses promoteurs P1, P2 et P3 sont conservés ; sur le locus IgH, les régions

régulatrices $E\mu$ et la LCR 3'IgH également. En ce qui concerne les deux autres types de BL, la translocation ne conserve que la partie codante de *c-myc* et son promoteur P3 ; au niveau du locus IgH, seule reste la région régulatrice en 3', $E\mu$ ayant été délété.

a) Points de cassure dans la région 8q24.



b) Points de cassure dans la région 14q32.



c) Réarrangements obtenus.

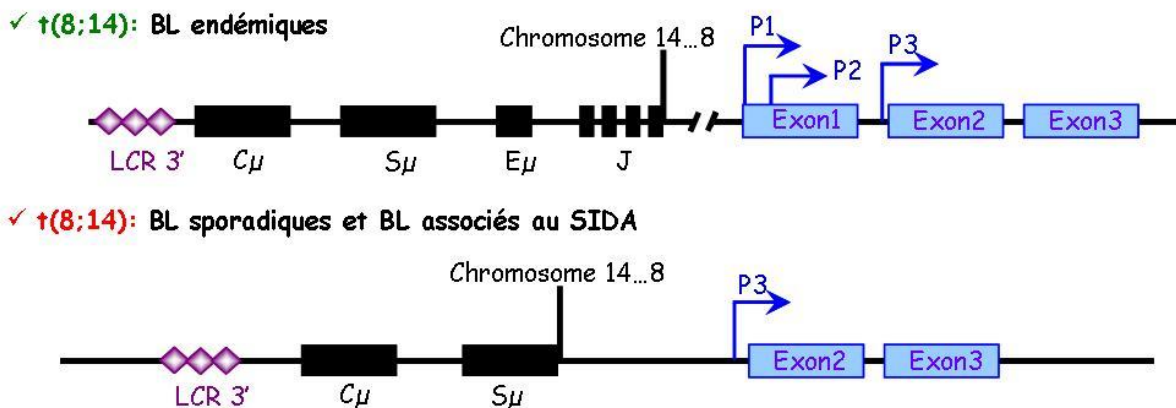


Figure 22 : Localisations des points de cassure dans la translocation $t(8;14)$.

a) : Points de cassure dans la région 8q24, par rapport au gène *c-myc*.

b) : Points de cassure dans la région 14q32, sur le locus IgH.

c) : Réarrangements obtenus dans le cas du BL endémique (classe III), et dans le cas des BL sporadiques et des BL associés au SIDA (classes I et II).

D'après (Hecht and Aster, 2000; Blum et al., 2004).

2.2.4.3. Mécanismes mis en jeu lors de la translocation de *c-myc*

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.2.2.1 concernant les évènements géniques transformants et plus particulièrement les translocations chromosomiques, le locus IgH constitue une zone critique pour de tels évènements de par les remaniements et les mutations auxquels il est sujet et les mécanismes précis ne sont pas encore totalement compris.

Récemment, il a été montré qu'AID joue un rôle dans la translocation *c-myc/IgH* en générant des cassures et des mutations au locus *c-myc* (Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008). Une étude a mis en évidence que les mêmes boucles R qui se forment dans les régions switch et qui sont la cible d'AID, se forment dans les régions du gène *c-myc* ciblées par les points de cassure (Duquette et al., 2005). De plus, des souris transgéniques *Eμ-Myc*, déficientes pour AID, développent des lymphomes de cellules pré-B, comparées aux souris transgéniques contrôles, qui développent des lymphomes de cellules B. Cette étude montre que AID facilite le développement de lymphomes B dans des souris transgéniques *c-myc*, en introduisant un deuxième facteur (*hit*) (Kotani et al., 2007), suggérant que cette enzyme joue un rôle à la fois lors de la translocation et pour l'expansion clonale. Cependant, en 2004, une étude avait montré que AID n'était pas indispensable au processus de translocation impliquant les loci *c-myc* et *IgH*, mais facilitait l'accumulation de changements génétiques nécessaires à la transformation (Unniraman et al., 2004).

2.2.4.4. Mécanismes de la dérégulation de *c-Myc*

✓ Dérégulation par les séquences régulatrices du locus IgH : Les premières études visant à comprendre le rôle des séquences régulatrices du locus IgH ont consisté à établir des souris transgéniques avec le gène *c-myc* placé sous contrôle de *Eμ*. Ces souris développent effectivement des tumeurs mais à un stade pré-B, ne reflétant pas le lymphome de Burkitt (Adams et al., 1985). Des souris portant un chromosome artificiel de levure dans lequel une portion de la région 5' IgH, contenant *Eμ* et *c-myc* sont insérés, développent également des tumeurs B, mais la délétion de *Eμ* engendre le même phénotype. De plus ces tumeurs n'ont pas un profil de cellules B matures (Butzler et al., 1997; Palomo et al., 1999). Par contre, lorsque *c-myc* est mis sous le contrôle de séquences régulatrices du locus *Igλ*, le transgène est exprimé de façon B spécifique et la souris développe des tumeurs avec un aspect de ciel étoilé, caractéristique du lymphome de Burkitt (Kovalchuk et al., 2000).

Cependant, 80% des BL sont caractérisés par une translocation au locus IgH. De plus, dans le cas des BL sporadiques et des BL associés au SIDA, *Eμ* est délété. De ce fait, la région régulatrice

située en 3' est suspectée comme ayant un rôle dans la dérégulation de l'expression de *c-myc*. En 1994, Madisen et Groudine ont montré, *in vitro*, que la LCR 3'IgH induisait un fort niveau d'expression de c-Myc, avec un changement de promoteur de P2 à P1 (Madisen and Groudine, 1994). Une étude a mis en évidence le rôle du site NF- κ B présent dans hs4, dans le changement de promoteur puisque la mutation du site supprime ce changement (Kanda et al., 2000).

In vivo, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été réalisés. Des souris portant une translocation mimant celle retrouvée dans le cas de BL endémique, développent des lymphomes, mais l'insertion du transgène dans la globalité du locus IgH, n'exclut pas un rôle de la structure chromatinienne environnante (Park et al., 2005a; Park et al., 2005b). Un autre modèle de souris, où *c-myc* est inséré dans la région 3' tronquée, développe aussi des tumeurs, mais là encore, la région pourrait coopérer avec des éléments régulateurs de *c-myc* (Wang and Boxer, 2005). Ainsi, au laboratoire, une souris portant une seule copie d'un transgène, *c-myc-3'IgH LCR*, a été développée. Ce transgène est encadré d'isolateurs le coupant ainsi de l'environnement chromatinien. Les auteurs ont montré que dans 75 % des cas, les souris développaient des tumeurs apparentées à un phénotype de BL (25 % étant apparentées à un phénotype de lymphome diffus anaplasique). Ainsi, la LCR 3'IgH seule suffit à déréguler *c-myc* (Truffinet et al., 2007).

✓ Mutations dans le gène *c-myc* : La majorité des allèles transloqués dans les BL présente des mutations ou des délétions, dont la plupart ont lieu à proximité des promoteurs P1 et P2 ou à la jonction intron1-exon1. Du fait de l'insertion de *c-myc* dans une région fortement soumise à la SHM, ce processus pourrait s'opérer sur le gène transloqué. (Boxer and Dang, 2001). Le phénomène d'ASHM a été mis en évidence sur le gène *c-myc*, puisque des mutations survenant avant la translocation (du fait de leur homozygotie) ont été retrouvées dans des cas de BL. Les mutations, se produisant sur des sites en lien avec la phosphorylation, peuvent contribuer à la lymphomagenèse (Bhatia et al., 1993; Hann, 2006). Deux mutants de c-Myc sont principalement retrouvés dans les BL : P57S et T58A (Chang et al., 2000; Hemann et al., 2005).

2.2.4.5. Le rôle de c-Myc

La translocation implique une expression constitutive de l'ARN de c-Myc et une accumulation de la protéine. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.3.2, les cibles de c-Myc sont nombreuses. Ainsi, son activation entraîne la croissance cellulaire, une prolifération incontrôlée et une augmentation de l'instabilité génétique. De plus, il réduit l'immunogénicité de la cellule tumorale (Schlee et al., 2007b). Cette caractéristique a été montrée par l'équipe de

Bornkamm en 2000. Les auteurs ont généré une LCL dépendante de l'œstrogène pour sa prolifération (la protéine EBNA2 ayant été fusionnée au récepteur de l'œstrogène). Dans un second temps, ils ont introduit dans cette lignée un gène *c-myc* (dont l'expression est contrôlable par la tétracycline) lui permettant de proliférer en l'absence d'œstrogène. Cette nouvelle lignée prolifère grâce à la forte expression de c-Myc et sans EBNA2, et a adopté un phénotype similaire aux cellules de BL. Grâce à cet outil, il a été montré que les cellules de cette nouvelle lignée avaient perdu leur capacité à présenter l'antigène (*via* le CMH de classe I) (Staege et al., 2002). Puis, les auteurs ont mis en évidence deux mécanismes par lesquels c-Myc permettait à la cellule tumorale d'échapper au système immunitaire : d'une part, par la régulation négative de nombreux gènes impliqués dans la réponse NF- κ B, et d'autre part, par l'altération de la réponse aux interférons (Schlee et al., 2007a). Enfin, alors que la surexpression de c-Myc active les voies apoptotiques (comme la voie p53), il a été montré que 30% des cellules de BL EBV-positifs ont la protéine p53 mutée, et dans le cas où elle n'est pas mutée, une surexpression de MDM2 ou la perte de p14^{ARF} est observée. Ainsi, dans la plupart des cas de BL, la voie p14^{ARF}-MDM2-p53 est altérée (Lindstrom and Wiman, 2002). Une autre voie apoptotique activée par c-Myc est la voie impliquant le facteur Bim, un inducteur de l'apoptose. Deux mutants de c-Myc souvent retrouvés dans les BL (P57S et T58A) stimulent la prolifération et activent p53, mais l'apoptose n'est pas induite car ces mutants ne permettent pas l'expression de Bim. A l'inverse, dans le cas où c-Myc induit Bim, des altérations inhibant la voie p14^{ARF}-MDM2-p53 sont retrouvées (Dang et al., 2005b; Hemann et al., 2005).

2.2.4.6. Le rôle de l'EBV

Contrairement à la translocation impliquant *c-myc*, le virus n'est pas associé à tous les cas de BL. Il est retrouvé dans 95% à 100% des cas de BL endémiques, dans 40 à 60 % des cas de BL associés au SIDA et dans 10 à 20 % des cas de BL sporadiques. Ainsi, c'est bien la translocation de *c-myc* qui définit un BL et non la présence de l'EBV, ce qui pose la question de son rôle dans la pathologie.

Un des évènements moléculaires clefs dans la pathologie du BL est l'activation du programme de prolifération induit par c-Myc (à travers sa translocation) et l'inactivation de son activité inductrice de l'apoptose. Quel est alors le rôle joué par l'EBV ? Les gènes transformants de l'EBV ne sont pas exprimés dans les BL EBV-positifs (latence I) et ne contribuent donc pas directement à la prolifération tumorale. Il a été proposé que l'EBV joue un rôle dans l'inhibition de l'activité apoptotique de c-Myc. En effet, il a été mis en évidence que certaines protéines du virus (EBNA1 et EBER) possèdent des propriétés anti-apoptotiques promouvant le processus tumoral (Komano et al.,

1999; Ruf et al., 1999; Kennedy et al., 2003). Cependant, cet effet reste modéré puisque la comparaison de clones de BL EBV positifs présentant des latences non-conventionnelles (expression de toutes les protéines EBNA mais pas des LMP ou expression des protéines EBNA sauf EBNA2) montre que la protection contre l'apoptose est différente selon les formes d'infection par le virus (Kelly et al., 2006).

Récemment, Thorley-Lawson et Allday ont proposé un mécanisme impliquant l'effet anti-apoptotique de l'EBV. En effet, ils suggèrent que le virus infecte la cellule B naïve et exprime ainsi son programme de prolifération (EBNA2). La prolifération du blaste infecté (latence III) passe par l'activation de *c-Myc* via EBNA2. EBNA2 induit la transcription des protéines EBNA3 A et C, qui à leur tour induisent la répression de Bim, et permettent ainsi à la cellule de se différencier en cellule du centre germinatif. A ce stade se produit la translocation de *c-myc*, aboutissant à la prolifération incontrôlée de la cellule, du fait de la répression de Bim. La cellule infectée quitte le centre germinatif afin de devenir une cellule mémoire. La protéine EBNA1 est exprimée par le virus, permettant la réplication de son génome viral alors que la cellule prolifère. Finalement, le programme de prolifération induit par *c-Myc* empêche la cellule infectée de se différencier en cellule mémoire et devient ainsi une cellule tumorale de BL exprimant seulement le programme EBNA1 (latence I) (Anderton et al., 2008; Thorley-Lawson and Allday, 2008).

Ainsi, le virus permettrait à la cellule pré-tumorale du BL de proliférer, favorisant l'émergence de la translocation de *c-myc*. Néanmoins, puisque tous les cas de BL ne sont pas associés à l'EBV, on peut alors considérer l'EBV comme un facteur de risque, au même titre que la malaria le cas des BL endémiques. L'infection par *Plasmodium falciparum* touche plus de 90% des enfants de moins de 5 ans dans les régions d'endémie palustre. Le rôle immunosuppresseur de la malaria (et également son possible rôle d'activation antigénique continue), permettrait à l'organisme de tolérer l'EBV et donc le phénomène de translocation du gène *c-myc*. Ainsi le rôle de cofacteurs immunosuppresseurs (comme l'infection par le VIH) est un facteur de risque.

Cependant, l'immunosuppression ne suffit pas à expliquer l'augmentation du risque de développer un BL. En effet, les désordres lymphoprolifératifs post-transplantations associés à l'EBV (PTLD) ont une morphologie différente des BL et l'expression des gènes de l'EBV diffère (latence III contre latence I) (Rochford et al., 2005; Thorley-Lawson and Allday, 2008). Notons que la différence principale entre l'immunosuppression médicamenteuse et celle liée à la malaria ou à l'infection par le VIH est l'intensité et la rapidité de son installation. L'infection par le VIH est caractérisée par une immunosuppression modérée avec un taux de lymphocytes T CD4 > 200/ μ l

pendant plusieurs années. De même, les enfants souffrant de paludisme chronique et de malnutrition sont soumis à des conditions d'immunosuppression différentes de celles induites par les médicaments. De fait, il existe certainement un lien entre la nature de l'immunosuppression, la réactivation de l'EBV et le type de lymphome qui lui est associé.

Au final, le lymphome de Burkitt et le rôle de l'EBV dans la pathologie laissent encore beaucoup de questions ouvertes (Bornkamm, 2009b; Bornkamm, 2009a).

CHAPITRE II : OBJECTIFS

Mon travail de thèse avait pour objectif l'étude de l'implication de c-Myc dans la lymphomagenèse des cellules B infectées par l'EBV. Il s'est articulé autour de trois axes de recherche.

Tout d'abord, j'ai collaboré aux travaux ayant abouti à la publication de l'article "*c-Myc and Rel/NF- κ B are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells*", paru dans *Journal of Virology* en mai 2009 (Faumont et al., 2009b). Nous nous étions posé la question de l'implication de c-Myc dans la prolifération des cellules B EBV+ en latence III. Afin d'y répondre, nous avons comparé les profils d'expression des programmes de prolifération induits d'une part par l'EBV et d'autre part par c-Myc, avec le profil d'expression des gènes de cellules B quiescentes, dont la prolifération a été stoppée par répression du programme EBV dans des cellules B immortalisées par le virus. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les deux systèmes transcriptionnels activés dans les cellules B EBV+ en latence III sont les facteurs c-Myc et NF- κ B. La présentation de cette étude est l'objet de la première partie du chapitre résultats.

A l'issue de ce travail et à partir d'autres travaux réalisés au sein du laboratoire (Le Clorennec et al., 2006; Le Clorennec et al., 2008), ainsi que ceux du groupe de G.W. Bornkamm (Schlee et al., 2007a), nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les cellules B EBV+ en latence III peuvent moduler la réponse immune T anti-EBV, notamment par l'intermédiaire des facteurs transcriptionnels c-Myc et NF- κ B, soit directement, soit en ciblant STAT1 (inhibé par c-Myc). Nous avons choisi d'étudier une des molécules de la synapse immunologique, la protéine B7-H1/CD274/PD-L1, co-inhibitrice de la réponse immune. La deuxième partie des résultats en présente les premières conclusions.

Enfin, tout au long de ma thèse et en parallèle de ces travaux, nous avons mis au point un nouvel outil moléculaire dans le but de transformer les cellules B en plaçant c-Myc sous le contrôle de la LCR 3'IgH. Récemment, une lignée de souris transgéniques portant une seule copie d'un transgène *c-myc-3'IgH LCR* a été conçue dans notre laboratoire. Cette lignée a permis de montrer que dans 75% des cas, les souris développent des tumeurs apparentées à un phénotype de BL, montrant l'implication de cette région dans la dérégulation de l'expression de l'oncogène (Truffinet et al., 2007). Cependant, même si des homologies de séquences sont retrouvées entre la LCR 3'IgH murine et la LCR 3'IgH humaine, des différences existent car, certains sites de fixation pour des facteurs de transcription retrouvés chez la souris sont absents chez l'homme. Ainsi, nous sommes intéressés à la fois à l'activité transcriptionnelle de la LCR 3'IgH humaine et à l'activité

transformante de l'oncogène *c-myc* sous la dépendance de la LCR 3'IgH humaine dans des cellules B. La troisième partie des résultats est consacrée aux premières études fonctionnelles utilisant ces nouveaux vecteurs.

CHAPITRE III : RESULTATS

1. C-MYC ET NF-κB : DEUX SYSTEMES TRANSCRIPTIONNELS MAJEURS DES CELLULES B EBV+ EN LATENCE III.

1.1. Introduction

Une des questions posée par le passage de la cellule B quiescente infectée par l'EBV vers sa contrepartie tumorale EBV+ est l'identification des voies transcriptionnelles cellulaires ciblées par le virus afin de reprogrammer la cellule. La cellule ainsi reprogrammée entre alors dans un processus de prolifération continue. La latence III (appelée programme de prolifération) est caractérisée par l'expression des protéines EBNA de l'EBV, qui permettent l'expression des protéines LMP, dont les propriétés transformantes ont largement été étudiées. Les deux principales voies cellulaires usurpées par le virus sont les voies Notch et NF-κB. EBNA2, l'équivalent de Notch, interagit avec le facteur RBP/Jκ et est responsable de l'arrêt de la différenciation cellulaire B mais cette voie n'est *a priori* pas impliqué dans la prolifération des cellules B EBV+ (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001). L'activation de la voie NF-κB est principalement due à LMP1 (mimétique fonctionnel de la voie CD40) et est associée à la protection contre l'apoptose (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001).

Une autre cible cellulaire de l'EBV est *c-myc*, dont l'expression est régulée par EBNA2 (Kaiser et al., 1999). Des études *in vitro* sur des cellules en latence I (cas des BL) ont montré que la dérégulation de *c-myc* seule ne permet pas la conversion de la cellule B normale en cellule tumorale et que d'autres altérations génétiques ou épigénétiques sont impliquées, comme des mutations dans les voies apoptotiques induites par c-Myc (cf 2.2.4.5) (Lindstrom and Wiman, 2002). Néanmoins, de telles altérations sont rares dans les cellules en latence III (LCL *in vitro* ou PTLD *in vivo*) (Poirel et al., 2005). De plus l'acquisition d'un programme de prolifération induit par la surexpression de c-Myc nécessite que le programme de latence III soit réprimé *in vitro* (Polack et al., 1996; Pajic et al., 2001) et *in vivo* (Kelly et al., 2002; Kelly et al., 2005), ce qui est en accord avec le fait que *c-myc* régule négativement le facteur NF-κB (Schlee et al., 2007a). Enfin, la surexpression de c-Myc dans les cellules de BL réprime les gènes de réponse à NF-κB et aux interférons, diminuant l'immunogénicité de la cellule B (Schlee et al., 2007b), alors que dans les cellules B EBV+ en latence III, l'activation constitutive de NF-κB par LMP1 phosphoryle et active le facteur STAT1, via une boucle autocrine de sécrétion des interférons (Najjar et al., 2005).

Ainsi, les programmes de prolifération associés à la latence I (donc à c-Myc) et à la latence III (donc à EBNA2) apparaissent incompatibles et un rôle direct de c-Myc dans la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV n'a jamais été démontré.

Dans cette étude nous avons voulu savoir si le programme de prolifération des cellules B EBV+ en latence III est en lien avec le programme de prolifération associé à c-Myc. Dans ce but, nous avons analysé le profil d'expression de lignées cellulaires en latence I (4 lignées de BL EBV+ : Elijah, Akata, Mukira et BL29), en latence III (3 LCLs classiques : LCL 1.11, 1.13 et 1.25) et de lignées particulières dont l'expression de *c-myc* ou de EBNA2 est modulable, respectivement par la tétracycline et par l'œstrogène (cf. **Figure 23**). Parmi ces lignées particulières, la lignée cellulaire EREB2-5 est une lignée lymphoblastoïde, contenant une protéine chimérique EBNA2-récepteur à l'œstrogène. Le programme de prolifération associé à la latence III peut être ainsi réversiblement induit ou réprimé par l'ajout ou le retrait d'œstrogène dans le milieu de culture (Kempkes et al., 1995). La lignée cellulaire P493-6, dérivée de la lignée EREB2-5, a été transfectée avec un vecteur Tet-off *c-myc*-inductible (Pajic et al., 2000). De fait, cette lignée est doublement inductible, d'une part pour EBNA2 (comme les EREB2-5) et d'autre part pour c-Myc (le programme de prolifération associé à c-Myc pouvant être réprimé par l'ajout de tétracycline dans le milieu). Cette lignée a été utilisée d'une part comme modèle d'étude du programme de prolifération associé à c-Myc (EBNA Off et c-Myc On, soit œstrogène - et tétracycline -) et d'autre part comme modèle supplémentaire d'étude de la latence III (EBNA On et c-Myc Off, soit œstrogène + et tétracycline +). Enfin, cette étude inclut également la lignée cellulaire A1, lignée dérivée également de la lignée EREB2-5 dans laquelle un minilocus *Igκ-c-myc* a été introduit, proliférant en l'absence d'œstrogène et présentant un profil de BL portant la translocation t(2 ;8) (Polack et al., 1996). Nous avons comparé le transcriptome de ces différentes lignées en prolifération associée à la latence III ou associée à c-Myc, aux cellules EREB2-5 privées en œstrogène qui entrent alors dans un état quiescent.

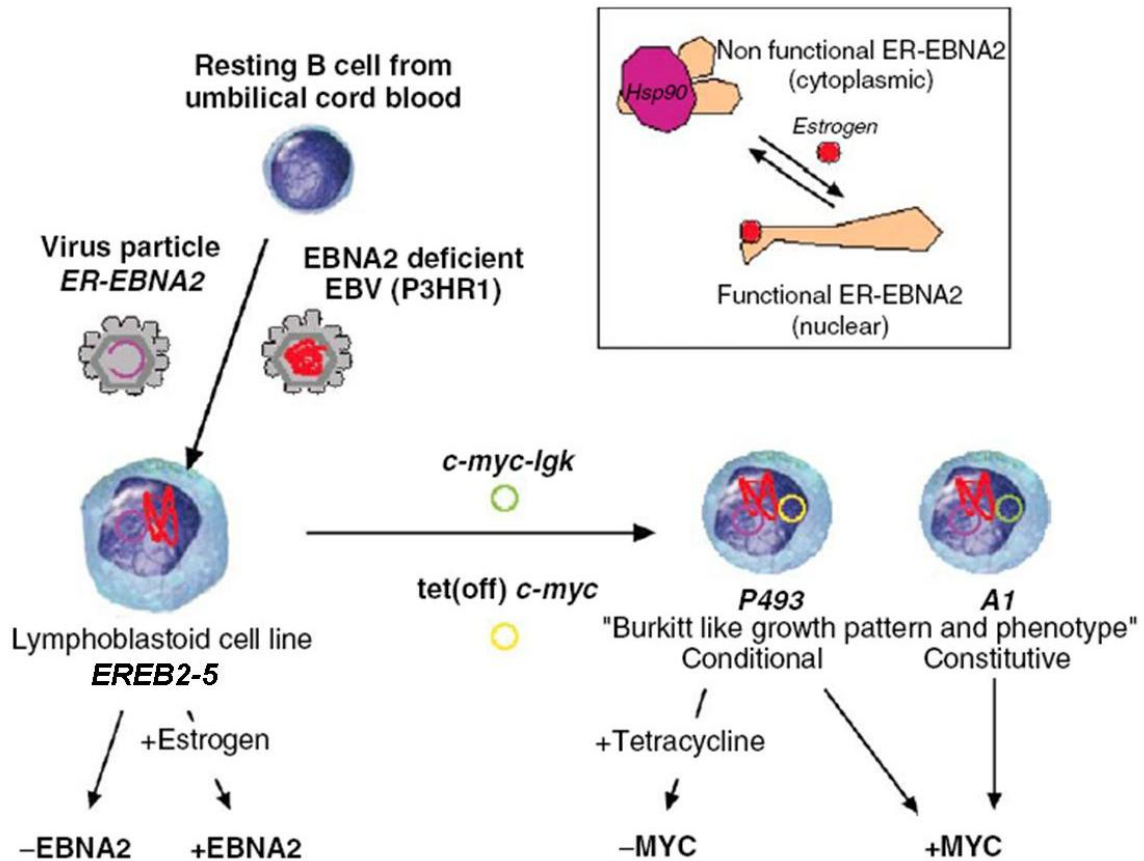


Figure 23 : Description des modèles cellulaires EREB2-5, P493-6 et A1.

Des cellules B primaires ont été infectées avec une souche de l'EBV déficiente pour EBNA2 issue de la lignée HH514 et par une protéine de fusion EBNA2 couplée au récepteur à l'œstrogène. Cette double infection a permis le développement d'une LCL dépendante pour sa prolifération et sa survie de l'œstrogène. Les EREB2-5 ont été ensuite transfectées avec un vecteur épisomal exprimant constitutivement *c-Myc* à un fort niveau (lignée A1) ou avec le gène *c-myc* régulable par la tétracycline (lignée P493-6). L'expression constitutive ou modulable de *c-Myc* a rendu ces lignées indépendantes de l'œstrogène (Schlee et al., 2007b).

1.2. Article

C-Myc and Rel/NF-κB are the Two Master Transcriptional Systems Activated in the Latency III Program of Epstein-Barr Virus-Immortalized B Cells.

Faumont N., Durand-Panteix S., Schlee M., Grömminger S., Schuhmacher M., H'zel M., Laux G., Mailhammer R., Rosenwald A., Staudt L.M., Bornkamm G.W. and Feuillard J.

Journal of Virology. 2009 May; 83 (10) : p. 5014-5027.

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02264-08>

1.3. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que 897 gènes sont régulés différemment dans au moins une des conditions des cellules proliférantes, en comparaison des cellules EREB2-5 quiescentes (induction ou répression supérieure d'un facteur 4). L'analyse statistique puis le classement hiérarchique de ces gènes a mis en évidence 10 classes de gènes : C1 (134 gènes), C2 (271 gènes) correspondent aux gènes sous-exprimés et C6 (256 gènes) aux gènes surexprimés dans les deux programmes de prolifération ; C3 (26 gènes) et C5 (32 gènes) sont les gènes respectivement réprimés et surexprimés principalement dans le programme associé à c-Myc ; et enfin C7-10 sont les gènes induits dans le programme de latence III relatif à l'EBV (159 gènes). Au final, 74 % de ces gènes (soit 661) sont régulés similairement dans les deux programmes de prolifération. La plupart des gènes réprimés sont des gènes cibles de STAT1 et la plupart des gènes induits sont des cibles connus de c-Myc, impliqués dans la prolifération cellulaire.

Suite à ces observations, nous avons testé sur des LCLs l'effet d'un inhibiteur chimique de c-Myc d'une part, et l'effet de l'expression conditionnelle d'un dominant négatif de c-Myc et d'un mutant de Max, d'autre part. Nous avons montré que l'inhibition de c-Myc aboutit à l'arrêt de la prolifération de ces cellules. Enfin, l'étude du transcriptome nous a permis de noter que la plupart des gènes (18%) régulés de façon différente dans les deux programmes de prolifération correspondent à des gènes induits par le facteur NF-κB dans les LCLs et que nombre d'entre eux codent des molécules immunorégulatrices et/ou antitapoptotiques.

Contrairement à ce qui pouvait être supposé d'après la littérature, les programmes de prolifération contrôlés par c-Myc et la latence III de l'EBV (dépendante d'EBNA2) ne sont pas incompatibles. Au contraire, c-Myc est une cible de l'EBV et son programme de prolifération est inclus dans le programme de latence III. De fait, nous avons conclu que c-Myc et NF-κB sont les deux principaux facteurs de transcription responsables du phénotype, du profil de prolifération et des propriétés biologiques des cellules proliférantes B EBV+ en latence III.

Remarque :

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, l'étude du transcriptome avait été effectuée dans le groupe de G.W. Bornkamm. J'ai directement participé à la réalisation des expériences concernant l'effet de l'inhibiteur chimique sur les LCLs et l'utilisation des dominants négatifs de c-Myc et Max (figures 5 et 6 de l'article). J'ai également contribué aux discussions relatives à l'écriture de

l'article. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr G.W. Bornkamm de l'Institut de Biologie Moléculaire et de Génétique des Tumeurs de Munich (Faumont et al., 2009b).

2. ROLES RECIPROQUES DE C-MYC ET DE L'EBV DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE B7-H1/CD274/PD-L1.

2.1. Introduction

Dans le cadre d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire, le concept proposant la nécessité de deux signaux permettant d'activer les cellules T a été formulé en 1975 par Lafferty et Cunningham (Lafferty and Cunningham, 1975). Le premier signal permettant une réponse immune spécifique est donné par l'interaction peptide-CMH et TCR. Le second signal costimulateur, indépendant de l'antigène, est délivré aux cellules T par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), permettant l'expansion clonale de la cellule T, la sécrétion de cytokines et la mise en place des fonctions effectrices. En l'absence de ce second signal, les lymphocytes ne répondent pas efficacement, sont anergiques et insensibles à une activation antigénique. Ce second signal peut également être un signal inhibiteur, aboutissant au phénomène de tolérance des cellules T. La résultante des signaux stimulateurs et inhibiteurs permet à la réponse immune un effet protecteur, tout en assurant le maintien d'une tolérance immunologique, neutralisant les réactions d'auto-immunité. La voie de co-signalisation B7-1/B7-2-CD28/CTLA4 est la mieux caractérisée. Les molécules B7-1 et B7-2 ont une double spécificité vis-à-vis des récepteurs de la famille CD28 : le récepteur stimulateur CD28 et le récepteur inhibiteur CTLA4. Alors que l'engagement du récepteur CD28 fournit un important signal co-stimulateur aboutissant à l'augmentation de la réponse cellulaire T, l'engagement du récepteur CTLA4 délivre un signal négatif inhibant les signaux médiés par le TCR et le CD28, la synthèse d'Il-2 et la progression dans le cycle cellulaire, mettant fin à la réponse T. Deux nouvelles voies de co-stimulation/inhibition ont récemment été identifiées : une impliquant un membre de la famille CD28 : ICOS (*Inducible B cell Costimulator*), qui interagit avec son ligand ICOSL et la seconde impliquant le récepteur PD-1 (*Program Death 1*) qui interagit avec les molécules B7-H1 (aussi appelée PD-L1 ou CD274) et B7-DC (dénommée également PD-L2 ou CD273) (Sharpe and Freeman, 2002).

B7-H1 est une protéine transmembranaire de type I de 290 acides aminés, codée par le gène *cd274* localisé sur le chromosome 9. Ce gène comprend 7 exons dont le premier est non-codant et contient la région 5'UTR. Les trois exons suivants contiennent respectivement la séquence signal, un domaine IgV-like et un domaine IgC-like. Les domaines transmembranaire et intracellulaire sont

codés par les exons 5 et 6. Le dernier exon code des résidus du domaine intracellulaire et la séquence 3'UTR (Keir et al., 2008). Un variant de B7-H1 issu d'un épissage alternatif, a été décrit. Ce variant ne contient pas le domaine IgV-like codé par l'exon 3 (absence des acides aminés 17 à 130) et n'est pas capable de se lier à PD-1, mais aucune fonction pour ce variant n'a été rapportée (He et al., 2005). Enfin, une troisième isoforme est décrite sur le site <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZQ7>. Cette isoforme ne contient pas les acides aminés 179 à 290 et l'acide aminé 118 est muté (lysine remplacée par acide aspartique).

Une analyse par Northern blot a montré une forte expression de l'ARNm humain de B7-H1 au niveau des cellules cardiaques, du muscle squelettique, du placenta et du poumon, ainsi que du thymus, de la rate, du rein et du foie, alors qu'il n'est que peu détectable au niveau du cerveau, du colon, de l'intestin et des PMBC (Dong et al., 1999). Les cellules B et T fraîchement isolées expriment de faibles niveaux de B7-H1, alors que 15% des monocytes CD14+ l'expriment constitutivement. Après activation, la majorité des cellules T CD3+ et 100% des monocytes CD14+ expriment B7-H1, mais seulement 5% des cellules B CD19+ l'expriment, même après engagement du BCR. Des études d'immunohistochimie ont montré que l'expression de la protéine humaine se limite aux macrophages infiltrant le foie, le poumon et les amygdales (Dong et al., 2002). La protéine est également exprimée de façon abondante sur les cellules du trophoblaste (Petroff et al., 2002).

Alors que l'on retrouve une expression constitutive de l'ARNm de B7-H1 dans de nombreux tissus, la protéine n'est pas détectée dans les cellules parenchymateuses du foie, du poumon, du pancréas, de l'utérus, du rein, du colon, du sein, du muscle et des lymphocytes des amygdales, suggérant une régulation de son expression au niveau post-transcriptionnel (Dong et al., 2002). Son expression peut être augmentée à la surface des monocytes, des cellules dendritiques et des kératinocytes par traitement des cellules à l'IFN- γ (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000). De façon générale, son expression est inductible par les interférons de type 1 et 2 sur différents types cellulaires (Eppihimer et al., 2002; Schreiner et al., 2004; Muhlbauer et al., 2006). L'analyse du promoteur de B7-H1 a montré que deux sites de fixation pour IRF-1 (*Interferon Response Factor 1*) sont responsables et nécessaires à son expression constitutive et inductible par l'IFN- γ . Le promoteur contient également un site de fixation pour NF- κ B (Lee et al., 2006). Des expériences de co-transfection dans la lignée 293T (cellules embryonnaires rénales humaines) de la protéine LMP1 ou LMP2 de l'EBV et du gène rapporteur *luciférase* placé sous le contrôle du promoteur de B7-H1 ont mis en évidence la capacité de ces deux protéines virales à activer le promoteur de B7-H1

(Yamamoto et al., 2008). Des travaux ont montré, via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, que l'expression de B7-H1 passe par les voies MEK/ERK, MyD88/TRAF6, JAK/STAT et Pi3K/Akt (Liu et al., 2007; Parsa et al., 2007). Enfin, des travaux récents ont montré que l'engagement de cette molécule induit l'apoptose, via la voie de signalisation JNK et l'expression du Fas-L sur des cellules B EBV+ (Kim et al., 2008).

Les effets immunologiques de la protéine B7-H1 sont doubles, puisqu'elle exerce une fonction co-stimulatrice sur les cellules T naïves et est capable d'inhiber les cellules T activées. D'une part, B7-H1 à la surface des CPA permet la costimulation de la sécrétion d'Il-10 par les cellules T en présence d'un signal anti-CD3 (Dong et al., 1999). D'autre part, l'expression de B7-H1 à la surface de la cellule cible (cellule infectée par un virus ou cellule tumorale, par exemple) peut inhiber l'engagement de la réponse T et les fonctions de la phase effectrice de la réponse immune T. Le mécanisme associé à ce rôle inhibiteur passe par l'engagement de son récepteur PD-1, ce qui induit un signal inhibant la progression dans le cycle cellulaire (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001; Keir et al., 2008). Un autre récepteur de B7-H1, récemment identifié, est B7-1, dont l'engagement inhibe également la réponse T (Butte et al., 2007). Notons que les fonctions costimulatrices de B7-H1 ne sont pas associées à PD-1, puisque ses effets costimulateurs sur la prolifération et la sécrétion de cytokines ont été observés sur des souris PD-1 *-/-* (Shin et al., 2003).

Ainsi, B7-H1 régule la tolérance immune vis-à-vis des tissus normaux. B7-H1 contribuerait également à l'échappement à la réponse immunitaire lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules cancéreuses. En effet, l'analyse par immunohistochimie de coupes de tissus issues de différents types de cancers montre une réactivité pour B7-H1, que ce soit au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme ou des deux (cas de cancers du poumon, de l'ovaire, du colon, de mélanome) (Dong et al., 2002). De fait, le rôle de B7-H1 dans l'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale a été étudié par le ciblage de cette molécule en immunothérapie. Des études ont rapporté que le blocage de B7-H1 ou PD-1 par l'utilisation d'anticorps augmente l'efficacité d'immunothérapies (Strome et al., 2003; Hirano et al., 2005; Thompson et al., 2005; Blank et al., 2006). De plus, de nombreuses études ont montré le rôle de la voie PD-1/B7-H1 dans les infections virales chroniques. En effet, l'expression de PD-1 est augmentée sur les cellules T spécifiques de l'infection par le HIV, le HCV et le HBV (Day et al., 2006; Petrovas et al., 2006; Trautmann et al., 2006; Urbani et al., 2006; Boni et al., 2007). L'augmentation de l'expression de B7-H1 a également été observée sur les monocytes périphériques du sang CD14+, les cellules myéloïdes de patients présentant une infection par le HBV, et sur les cellules T et CD14+ de

patients atteints de HIV (Trabattoni et al., 2003; Geng et al., 2006; Chen et al., 2007). Suite à ces observations les auteurs ont bloqué l'interaction PD-1/B7-H1 permettant la restauration de la prolifération et de la sécrétion de cytokines par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans les cas des infections précédemment citées. Enfin, récemment, une équipe a suivi l'expression de B7-H1 sur des cellules B suite à l'infection par l'EBV et a montré que l'infection augmente à la fois l'expression membranaire et totale de cette protéine (Kim et al., 2008).

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique, le virus d'Epstein-Barr (EBV), de la famille des *gammaherpèsvirus*, est communément retrouvé chez l'homme, puisqu'il infecte plus de 90% de la population mondiale. La résolution de la primo-infection, le plus souvent bénigne et asymptomatique, est due à une réponse immune T cytotoxique vigoureuse. Cependant, le virus persiste à l'état latent dans le réservoir B mémoire et peut-être associé à différents cancers tels que des lymphomes B (BL, HL), des lymphomes T, ou encore le carcinome du rhinopharynx. Plusieurs études ont montré que le modèle de prolifération induit par l'EBV résulte d'un équilibre subtil entre l'activation simultanée de facteurs impliqués dans la prolifération et la survie et de facteurs impliqués dans la mort cellulaire.

LMP1, protéine majeure transformante du virus, joue un rôle de protection contre l'apoptose, *via* l'activation continue du facteur NF- κ B, mais est également responsable de l'activation du facteur apoptotique STAT1 et de la surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas/CD95 (Huen et al., 1995; Najjar et al., 2005; Le Clorennec et al., 2006). Il est également connu qu'à de fort niveau d'expression, LMP1 est cytotoxique, en effet, cette protéine virale augmente l'immunogénicité des cellules B vis-à-vis des lymphocytes et peut induire l'apoptose par auto-agrégation du récepteur Fas (Le Clorennec et al., 2006; Le Clorennec et al., 2008). Ainsi, LMP1 est un oncogène ambivalent qui, selon son niveau d'expression, module les interactions de la cellule B EBV⁺ avec son microenvironnement et contrôle la balance survie/apoptose. Le profil des gènes régulés par LMP1 suggère un rôle possible de cette protéine dans la modulation de la réponse immunitaire. Parmi eux, on note des gènes codant des chimiokines (CC117), des cytokines (hIL-10, IL-6), des molécules d'adhésion (LFA1, ICAM), des gènes impliqués dans la présentation de l'antigène (HLA classe I et II) et les gènes codant les molécules B7-1 et B7-2 (Middeldorp and Pegtel, 2008). Un autre mécanisme par lequel LMP1 peut également moduler la réponse immunitaire est la sécrétion d'exosomes, vésicules d'origine endosomale, riches en molécules de co-stimulation et de CMH de classe II, pouvant interagir avec le TCR (Dukers et al., 2000). Il est admis d'une façon générale que,

notamment grâce à la protéine LMP1 du virus, les latences II et III de l'EBV sont des états immunogènes.

L'étude du transcriptome des cellules EBV+ en latence III a montré que les deux facteurs transcriptionnels activés sont NF- κ B et c-Myc. La plupart des gènes régulés différemment dans les deux programmes de prolifération sont des gènes induits par NF- κ B dans les LCLs et codent des molécules immunorégulatrices ou antiapoptotiques (Faumont et al., 2009b). Nous savons également que c-Myc diminue l'immunogénicité des cellules issues de BL et qu'il est capable de réguler négativement NF- κ B et la réponse aux interférons, en régulant négativement le facteur proapoptotique STAT1 (Schlee et al., 2007a; Schlee et al., 2007b). Ainsi, nous nous sommes posé la question de la modulation de la réponse immune T anti-EBV, via l'étude de la régulation de l'expression de la molécule B7-H1 dans les cellules B EBV+ par les facteurs NF- κ B et c-Myc.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires utilisés dans le cadre de cette étude sont deux lignées de lymphome de Burkitt BL2 et BL41, infectées (BL2+, BL41+) ou non (BL2, BL41) par l'EBV et les LCLs PRI, EREB2-5 et P493-6, ces deux dernières étant des LCLs particulières. La lignée EREB2-5 est une LCL contenant une protéine chimérique EBNA2-récepteur à l'œstrogène. Le programme de prolifération associé à la latence III peut être ainsi réversiblement induit ou réprimé par l'ajout ou le retrait d'œstrogène (1 μ M) dans le milieu de culture (Kempkes et al., 1995). La lignée cellulaire P493-6 est dérivée de la lignée EREB2-5, transfectée avec un vecteur Tet-off *c-myc*-inductible (Pajic et al., 2000). De fait, cette lignée est doublement inductible, d'une part pour EBNA2 (comme les EREB2-5) et d'autre part pour *c-myc* (le programme de prolifération associé à c-Myc pouvant être réprimé par l'ajout de tétracycline à 100 ng/ml dans le milieu). Ces lignées sont cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté tétracycline-free (D. Dutscher, Brumath, France), 100 U/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine et 2 mM de l-glutamine (Gibco BRL-Life Technologies), sous atmosphère humide, dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. La lignée EREB2-5 est cultivée en présence d'oestradiol (1 μ M). La lignée P493-6 est cultivée de façon continue en l'absence d'œstrogène et de tétracycline (Sigma-Aldrich) ; l'induction du programme EBNA2 et l'extinction du programme c-Myc sont réalisées respectivement par l'ajout d'œstrogène (1 μ M) et de

tétracycline (100 ng/ml) pendant 48h. Les LCLs PRI et EREB2-5 et les lignées de BL2/41 EBV-/+ ont été traitées par l'inhibiteur chimique de c-Myc : 10058-F4 [(Z,E)-5-(4-éthylbenzylidène)-2-thioxothiazolidin-4-one], à 70 µM pendant 48 heures, concentration pour laquelle la majorité des cellules sont accumulées en phase G₀/G₁ (Faumont et al., 2009b).

2.2.2. PCR quantitative

L'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide du kit Qiagen RNeasy Mini-kit, selon les recommandations du fournisseur. La Q-PCR a été réalisée comme décrit précédemment par (Gabert et al., 2003; Baran-Marszak et al., 2004). Nous avons défini un *pool* de référence, dont l'ARN a été extrait à partir de 5 échantillons de sang de patients sains. Les niveaux d'ARN de c-Myc, de B7-H1/CD274 et de LMP1 ont été quantifiés en parallèle dans les différents échantillons d'ARN et dans le *pool* d'ARN sur l'automate ABI PRISM 7000, grâce à l'utilisation du kit TaqManR Assay on Demand (Applied Biosystems, Foster City, USA ; références des produits : c-Myc : Hs00153408_m1 et B7-H1/CD274 : hs01125296_m1). Le gène *CD19* a été utilisé comme gène de référence pour le contrôle de l'amplification (Hs00174333_m1). Toutes les mesures d'amplifications ont été réalisées en *duplicate*. Le calcul du taux d'expression relatif du gène (TER) équivaut à $2^{-\Delta\Delta CT}$, où $\Delta\Delta CT$ est le delta-delta seuil de cycle, comme précédemment décrit (Gabert et al., 2003; Baran-Marszak et al., 2004).

2.2.3. Cytométrie en flux

Le marquage membranaire des cellules est réalisé à l'aide d'un anticorps anti-B7-H1/CD274 couplé à la phycoérythrine (PE) (clone 29EA, Biolegend) ou de son contrôle isotypique (*mouse* IgG2b, κ, Biolegend). Les cellules sont incubées 20 minutes à 4°C et à l'obscurité. Le marquage total des cellules est effectué à l'aide du kit intraprep (Becman Coulter Immunotech), selon les recommandations du fournisseur. Les analyses ont été réalisées sur le cytomètre FACSCalibur (BD Pharmingen) et traitées à l'aide du logiciel BD CellQuest Pro (Beckton Dickinson). Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de la fluorescence émise par le marquage B7-H1 et celle émise par le marquage avec l'isotypique.

2.2.4. Microscopie confocale

Le marquage membranaire est réalisé à partir de 250 000 cellules, incubées avec l'anticorps anti-B7-H1/CD274-PE (clone 29E.2A3, Biolegend, France) ou son contrôle isotypique (anti-IgG2b κ murin) pendant 45 minutes, à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite fixées par 4% de PFA

pendant 15 minutes. 1 µl de Hoechst 33342 (HO42) à 1 mg/ml sont ajoutés, puis les cellules sont montées entre lame et lamelles et observées immédiatement en microscopie confocale.

Le marquage total nécessite 250 000 cellules, fixées par 4% de PFA pendant 15 minutes, puis les cellules sont perméabilisées avec du triton X100 à 0,1% pendant 5 minutes et incubées avec l'anticorps anti-B7-H1/CD274-PE ou son contrôle isotypique pendant 15 minutes. 1 µl de Hoechst 33342 à 1 mg/ml sont ajoutés, puis les cellules sont montées entre lame et lamelles et observées immédiatement en microscopie confocale.

Les analyses ont été effectuées avec un microscope confocal MSL 510 (Zeiss, LePecq, France), et un grossissement × 63. Le HO42 est excité à 405 nm et la PE à 488 nm. Les images ont ensuite été analysées avec le logiciel LSM Image Browser (Zeiss) et la quantification de la fluorescence totale des cellules à l'aide du logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de la fluorescence émise par le marquage B7-H1 et celle émise par le marquage avec l'isotypique.

2.2.5. Western-blot

Les extraits protéiques de 10 millions de cellules sont lavés et remis en suspension dans 100 µl de tampon de lyse Blue Laemmli, additionné de 5% de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad). Les lysats sont soumis aux ultra-sons, centrifugés et conservés à -20°C. Le Western-blot a été réalisé comme précédemment décrit (Le Clorennec et al., 2006). Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-B7-H1/CD274 (clone H130, dilué au 1/200^{ème}, Santa Cruz Biotechnologie, USA), anti-c-Myc (clone 9E10, dilué au 1/200^{ème}, Santa Cruz Biotechnologie), anti-LMP1 (clone S12, dilué au 1/100^{ème}, issu d'un hybridome) et anti-α-tubuline (clone B5.2.1, dilué au 1/10 000^{ème}, Sigma-Aldrich). Les anticorps secondaires correspondant (Ac de chèvre anti-souris ou Ac de chèvre anti-lapin) couplés à la peroxydase sont incubés pendant 45 minutes (dilués au 1/5000^{ème}, Bio-Rad). La révélation est réalisée par chimiluminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham, Orsay, France) puis par autoradiographie (films X-Omat R, Sigma-Aldrich).

2.3. Résultats

2.3.1. Augmentation de l'expression des transcrits B7-H1 dans les cellules B EBV+

Nous avons quantifié le niveau d'expression des transcrits (ARNm) de B7-H1 dans des LCLs (lignées PRI et EREB2-5) et dans des lignées de lymphomes de Burkitt (BL), infectées (BL2+, BL41+) ou non par l'EBV (BL2, BL41). La référence cellulaire choisie (*pool* de référence) pour quantifier en valeur relative l'expression des ARNm, est issue de 5 échantillons de sang de patients sains, dont les PBMC ont été récupérés après passage sur gradient de Ficoll, et les ARNm extraits. Le gène de référence utilisé est le gène *CD19*, gène exprimé constitutivement par les cellules B et moins variant dans nos lignées que des gènes de référence tels *Abl1*.

Nous observons une forte expression de l'ARNm de B7-H1 dans les lignées infectées par l'EBV (LCLs PRI et EREB2-5, ainsi que BLs EBV+) en comparaison des BLs EBV-, dont l'expression est par ailleurs inférieure au *pool* de référence dont le TER est rapporté à 1 (cf. **Figure 24**).

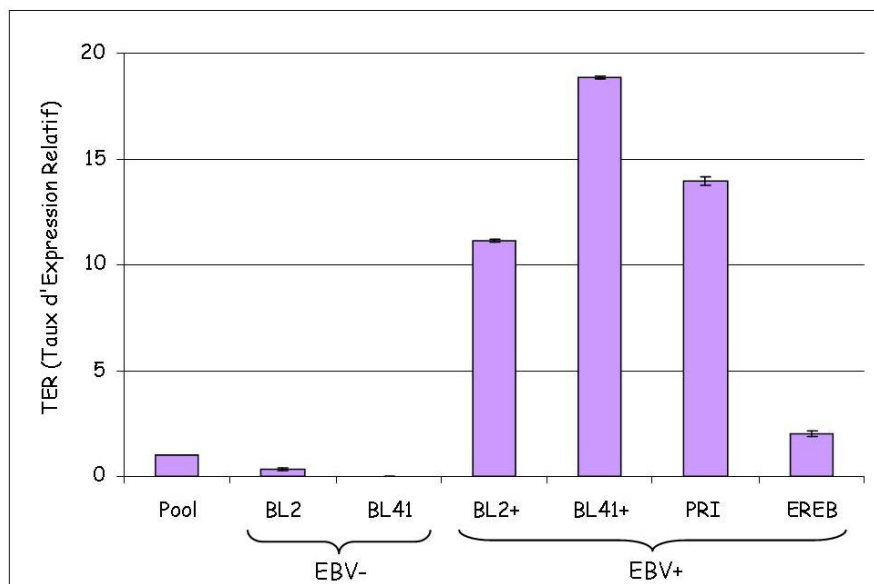


Figure 24 : Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux d'ARNm de *B7-H1* de lignées EBV- vs EBV+.

Pour chaque ARNm (lignées test et pool) nous avons quantifié l'expression de *B7-H1* et de *CD19* et obtenu une valeur de CT (cycle threshold). Le pool a été choisi comme référence. Nous avons calculé pour chaque échantillon le ΔCT ($= CT \text{ B7-H1} - CT \text{ CD19}$), puis le $\Delta\Delta CT$ ($= \Delta CT \text{ B7-H1}$ de l'échantillon - $\Delta CT \text{ B7-H1}$ du pool) et enfin le taux d'expression relatif ou TER ($= 2^{-\Delta\Delta CT}$). Au final, l'expression de l'ARNm de *B7-H1* a été rapportée à l'expression du gène *CD19* pour chaque condition, puis chaque lignée a été comparée au pool de référence dont le TER est égal à 1. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Ainsi, B7-H1 semble être une cible transcriptionnelle de l'EBV et son expression est diminuée dans les lignées de BL EBV- par rapport au *pool*.

2.3.2. Augmentation de l'expression de B7-H1 à la membrane des cellules B EBV+

B7-H1 est une molécule membranaire. Nous avons donc étudié son expression à la surface des cellules B EBV+ en comparaison des cellules de Burkitt non infectées. Nous avons effectué un marquage membranaire de B7-H1 et analysé l'expression de cette molécule par microscopie confocale et par cytométrie en flux (cf. ***Figure 25***). Nous avons utilisé comme référence le contrôle isotypique associé à cet anticorps. L'analyse en microscopie confocale nous permet d'observer un marquage à la membrane des cellules EBV+, contrairement aux cellules EBV- (cf. ***Figure 25a***). Nous avons quantifié la fluorescence émise par la PE en microscopie confocale. De plus, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression membranaire de B7-H1. Les résultats issus des deux techniques sont représentés en ***Figure 25b***. Ils sont exprimés par un rapport entre l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage avec l'Ac anti-B7-H1 et celle émise par le marquage avec le contrôle isotypique.

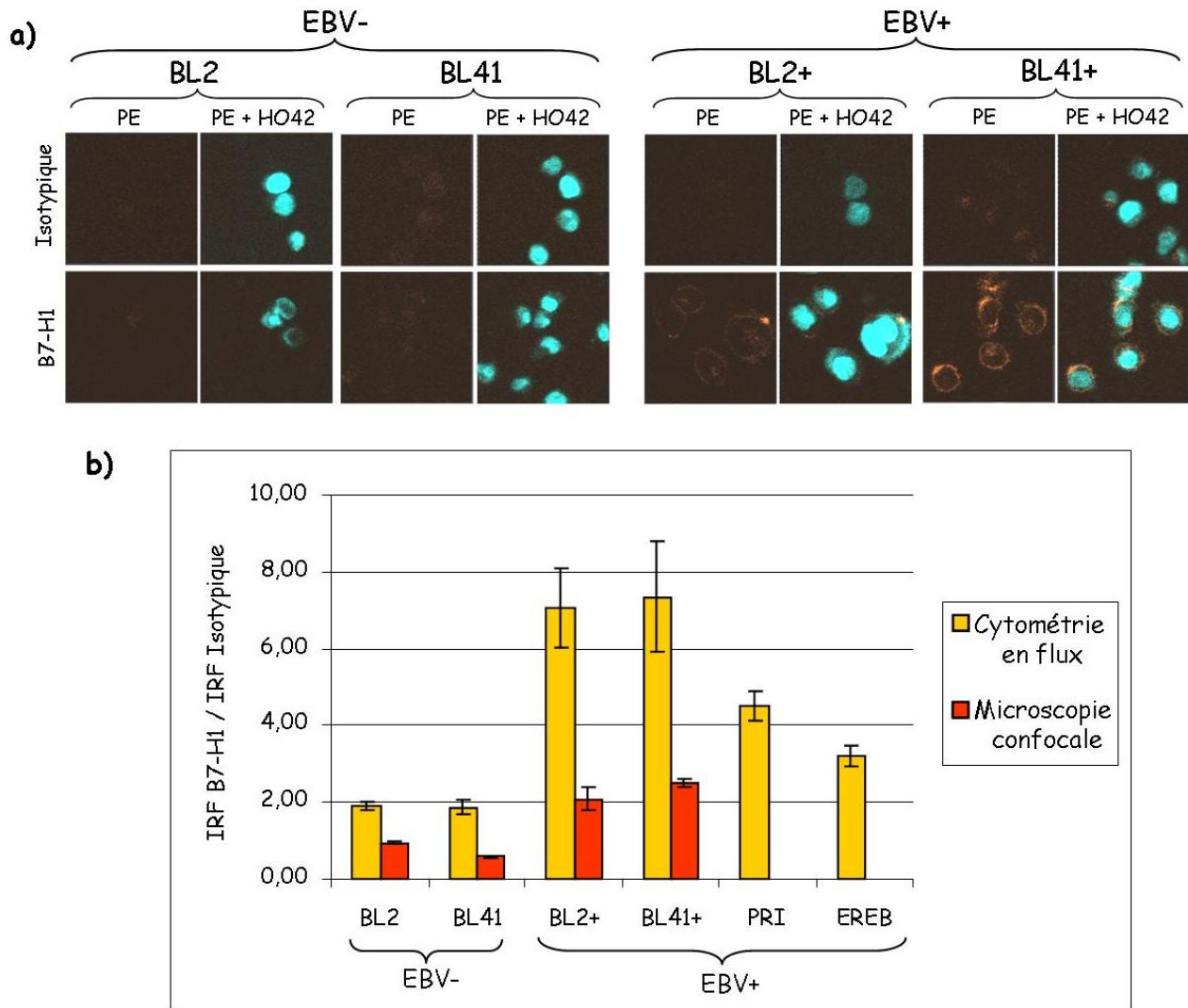


Figure 25 : Analyse de l'expression membranaire de *B7-H1* par microscopie confocale et cytométrie en flux de lignées EBV- vs EBV+.

a) : Analyse par microscopie confocale de l'expression membranaire de *B7-H1*. La première ligne représente les marquages avec le contrôle isotypique couplé à la PE et la seconde ligne le marquage avec l'anticorps anti-*B7-H1* couplé à la PE. Pour chaque lignée, la première colonne représente les résultats obtenus en PE et la deuxième colonne, la superposition des marquages PE et Hoescht 33342 (HO42, marqueur nucléaire).

b) : Représentation graphique de l'expression membranaire de *B7-H1* : analyse par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage *B7-H1* et l'intensité relative de fluorescence émise par le contrôle isotypique (soit $IRF\ B7-H1/IRF\ Isotypique$). Les barres d'erreurs représentent 12 expériences indépendantes en cytométrie en flux et 2 expériences indépendantes en microscopie confocale.

2.3.3. Non influence de l'EBV sur la quantité totale de protéine *B7-H1* dans la cellule

Nous avons réalisé ensuite un marquage du contenu total de *B7-H1* dans les cellules (cytoplasmique et membranaire) suite à leur fixation et perméabilisation. Nous avons observé ce

marquage en microscopie confocale (cf. **Figure 26a**). Puis nous avons quantifié les intensités de fluorescence émises en microscopie confocale et en cytométrie en flux, afin d'exprimer l'expression totale relative de B7-H1 (IRF B7-H1/IRF Isotypique) (cf. **Figure 26b**). Les résultats obtenus nous indiquent que le contenu total de B7-H1 ne semble pas être influencé par la présence de l'EBV. De plus, nous remarquons une forte expression de B7-H1 totale dans toutes les lignées; expression nettement plus forte que l'expression de B7-H1 à la membrane des cellules EBV+ (cf. échelle de l'axe des ordonnées de la **Figure 25b** en comparaison de celle de la **Figure 26b**). Nous avons retrouvé cette expression totale apparemment équivalente entre les lignées EBV- et EBV+ en Western-blot, dont le contrôle de charge est l' α -tubuline (cf. **Figure 26c**).

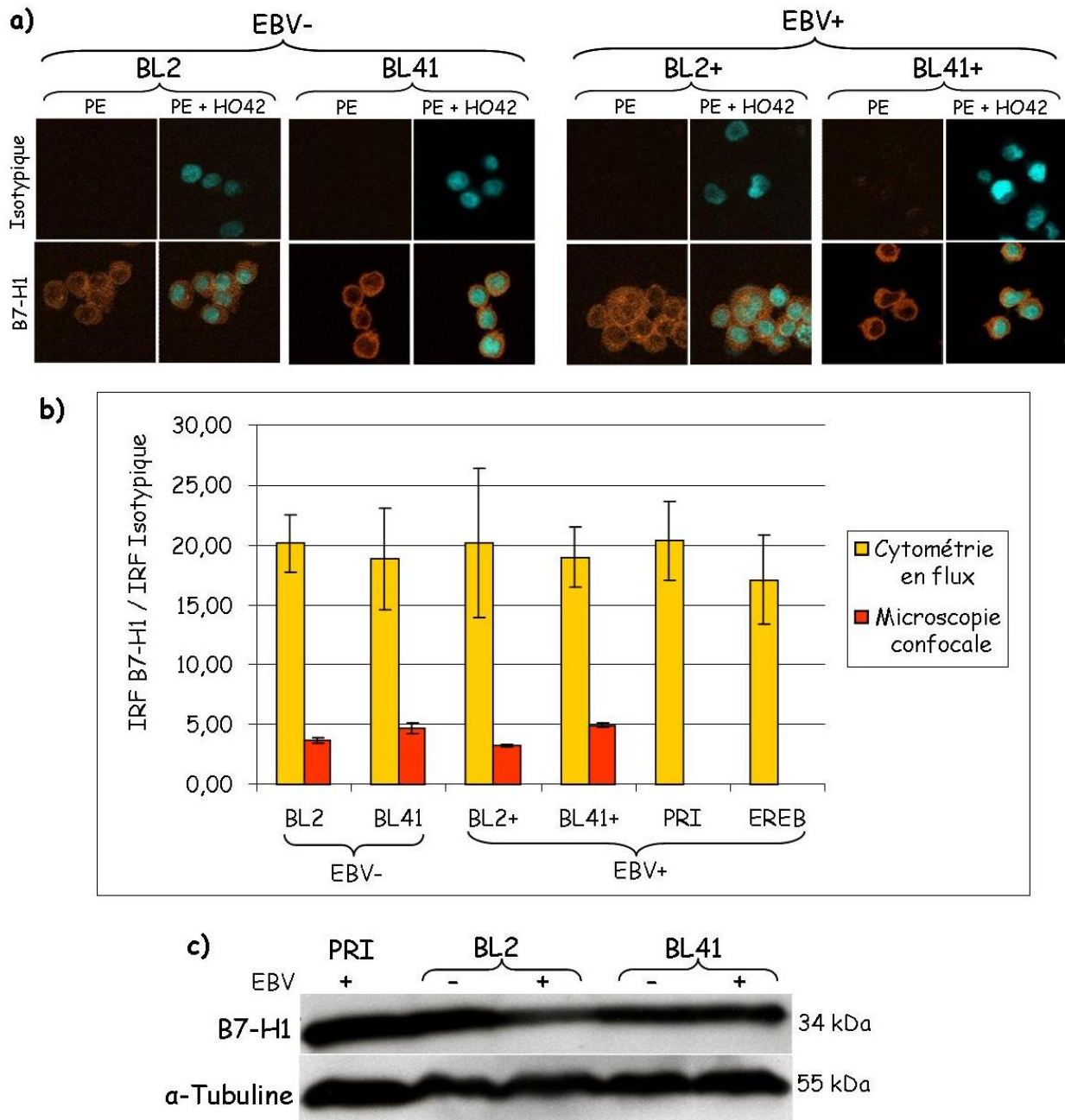


Figure 26 : Analyse de l'expression totale de *B7-H1* par microscopie confocale, cytométrie en flux et Western-blot dans des lignées *EBV*- vs *EBV*+.

a) : Analyse par microscopie confocale de l'expression totale de *B7-H1*. La première ligne représente les marquages avec le contrôle isotypique couplé à la PE et la seconde ligne le marquage, après perméabilisation, avec l'anticorps anti-*B7-H1* couplé à la PE. Pour chaque lignée, la première colonne représente les résultats obtenus en PE et la deuxième colonne, la superposition des marquages PE et Hoescht 33342 (HO42, marqueur nucléaire).

b) : Représentation graphique de l'expression totale de *B7-H1* : analyse par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage *B7-H1* et l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage avec le contrôle isotypique (soit $IRF\ B7-H1/IRF\ Isotypique$). Les barres d'erreurs représentent 12 expériences indépendantes en cytométrie en flux et 2 expériences indépendantes en microscopie confocale.

c) : Analyse de l'expression de *B7-H1* par Western-blot. L' α -tubuline est le contrôle de charge.

Nos résultats suggèrent l'existence d'un *pool* intracytoplasmique de molécules B7-H1, non régulé par l'EBV.

2.3.4. Contrôle transcriptionnel de B7-H1 par c-Myc

L'ARNm de B7-H1 est exprimé dans de nombreux tissus tumoraux dont le pouvoir prolifératif est lié à l'expression de c-Myc. Puisque, d'une part le programme de prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV dépend de c-Myc, et que d'autre part l'expression de c-Myc est associée à une diminution de l'immunogénicité des cellules B de lymphomes de Burkitt, nous nous sommes posé la question du rôle de c-Myc dans la régulation de l'expression de B7-H1.

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé la lignée P493-6 dont l'expression de c-Myc est modulable grâce à la tétracycline, son ajout dans le milieu de culture permettant de réprimer l'expression de c-Myc. Ces cellules ont été cultivées pendant 48 h en présence ou non d'œstrogène (1 μ M, soit E1 vs E0) et/ou de tétracycline (100 ng/ml, soit T100 vs T0) dans le milieu de culture des cellules. Nous avons ainsi étudié les quatre conditions suivantes afin de comparer l'expression de B7-H1 en présence ou en l'absence de l'EBV et/ou de c-Myc : E0T100 (EBNA-/Myc-), E0T0 (EBNA-/Myc+), E1T100 (EBNA+/Myc-) et E1T0 (EBNA+/Myc+). Nous avons mesuré dans un premier temps l'expression de l'ARNm de B7-H1, de c-Myc (contrôle de la modulation de son expression par la tétracycline) et de LMP1 (contrôle de la modulation de son expression par l'œstrogène) pour les 4 conditions de culture par rapport au *pool* de référence et au gène *CD19*. Il s'avère que l'extinction du programme c-Myc augmente le niveau d'expression de l'ARNm de B7-H1 (EBNA-/Myc+ comparé à EBNA-/Myc- et EBNA+/Myc+ comparé à EBNA+/Myc-) (cf. **Figure 27**). De plus, l'induction du programme EBV par l'ajout d'œstrogène dans le milieu augmente le niveau d'ARNm de B7-H1 (EBNA+/Myc+ et EBNA+/Myc-, en comparaison de EBNA-/Myc+ et EBNA-/Myc-). Cette dernière observation devra cependant être confirmée par d'autres expériences indépendantes ; en effet, la différence entre les conditions EBNA-/Myc- et EBNA+/Myc+ étant relativement faible (cf. **Figure 27**).

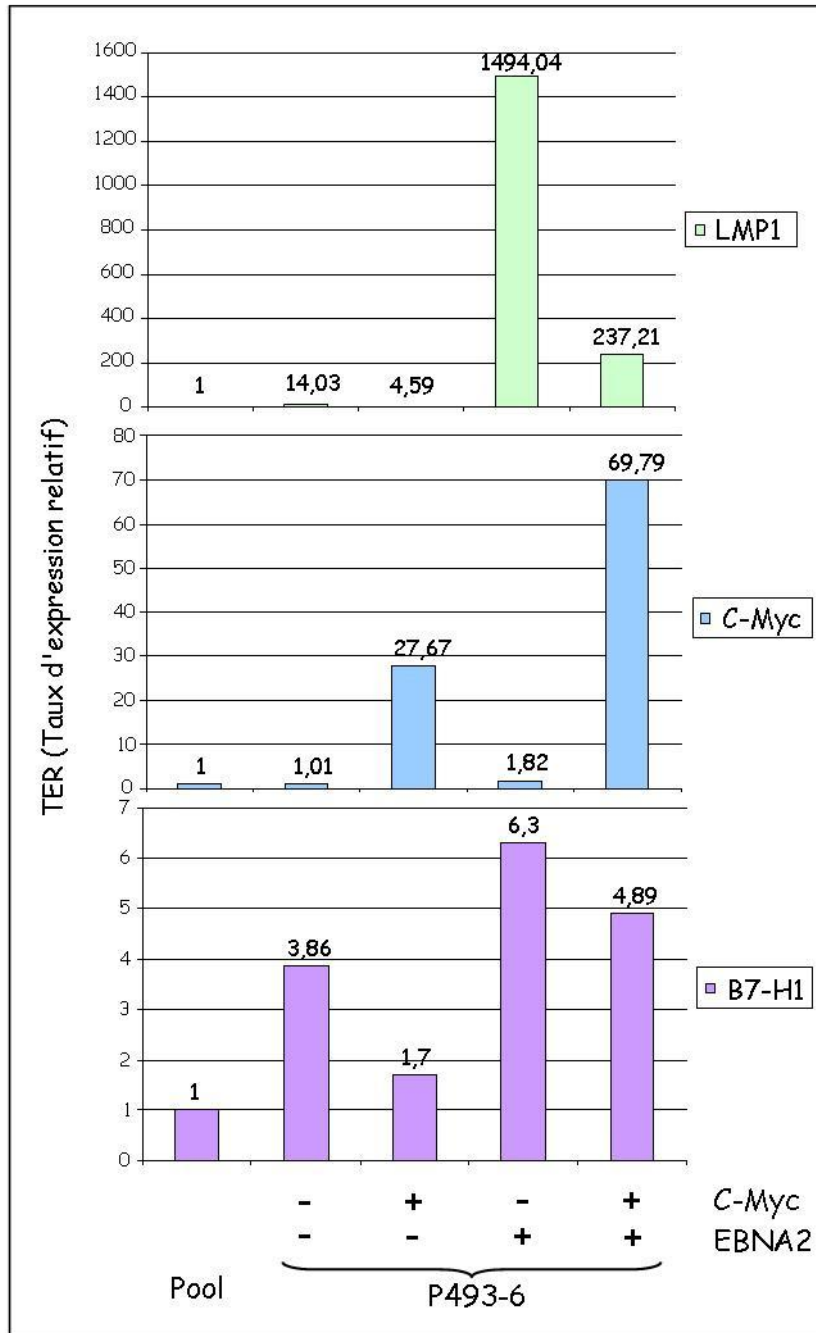


Figure 27 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de B7-H1 en fonction de l'expression de c-Myc.

La lignée P493-6 a été cultivée pendant 48 heures en présence (Myc-) ou non (Myc+) de 100ng/ml de tétracycline et en présence (EBNA+) ou non (EBNA-) de 1µM d'œstrogène, puis les ARN ont été extraits. Pour chaque ARNm (lignée test et pool) nous avons quantifié l'expression de B7-H1, de c-Myc, de LMP1 et de CD19. Les résultats sont analysés comme pour la **Figure 24**, le taux d'expression relatif correspond à $2^{-\Delta\Delta CT}$. L'expression de l'ARNm de B7-H1, de c-Myc et de LMP1 a été rapportée à l'expression du gène CD19 pour chaque condition, puis au pool de référence dont le TER est égal à 1. Le cadran supérieur représente le TER de LMP1, le cadran intermédiaire, le TER de c-Myc, et le cadran inférieur, le TER de B7-H1.

2.3.5. Répression de l'expression membranaire de B7-H1 par c-Myc

Toujours sur cette même lignée et pour les 4 mêmes conditions de culture, nous avons analysé l'expression membranaire de B7-H1 en fonction de l'expression de c-Myc (cf. **Figure 28**). Pour ce faire nous avons réalisé les marquages membranaires de B7-H1 pour les différentes conditions de culture des P493-6 décrites précédemment, par microscopie confocale (cf. **Figure 28a**). Puis nous avons quantifié la fluorescence émise à la fois en microscopie confocale et en cytométrie en flux. Les résultats représentent le ratio entre l'intensité de fluorescence émise par le marquage avec l'anticorps anti-B7-H1 et celle émise par le marquage avec le contrôle isotypique (cf. **Figure 28b**).

Nous observons que c-Myc réprime l'expression membranaire de B7-H1, indifféremment de l'induction du programme EBNA2 (EBNA-/Myc+ comparé à EBNA-/Myc- et EBNA+/Myc+ comparé à EBNA+/Myc-). Que ce soit en microscopie confocale ou en cytométrie en flux, l'induction de B7-H1 à la membrane suite à la répression est significative (t-test, $p < 0.05$).

Pour finir, afin de confirmer les résultats concernant l'effet de la répression de c-Myc sur l'externalisation de B7-H1, nous avons utilisé un inhibiteur chimique de c-Myc (10058-F4) sur les modèles cellulaires précédemment utilisés (LCLs PRI et EREB2-5 ainsi que BLs EBV- vs BLs EBV+). L'analyse de l'expression membranaire relative de B7-H1 a été réalisée par cytométrie en flux et les résultats sont exprimés par le ratio IRF B7-H1/IRF Isotypique. Il apparaît que l'inhibition de c-Myc permet une augmentation de l'expression membranaire de B7-H1 dans toutes les lignées testées, indépendamment de la présence de l'EBV (cf. **Figure 28c**).

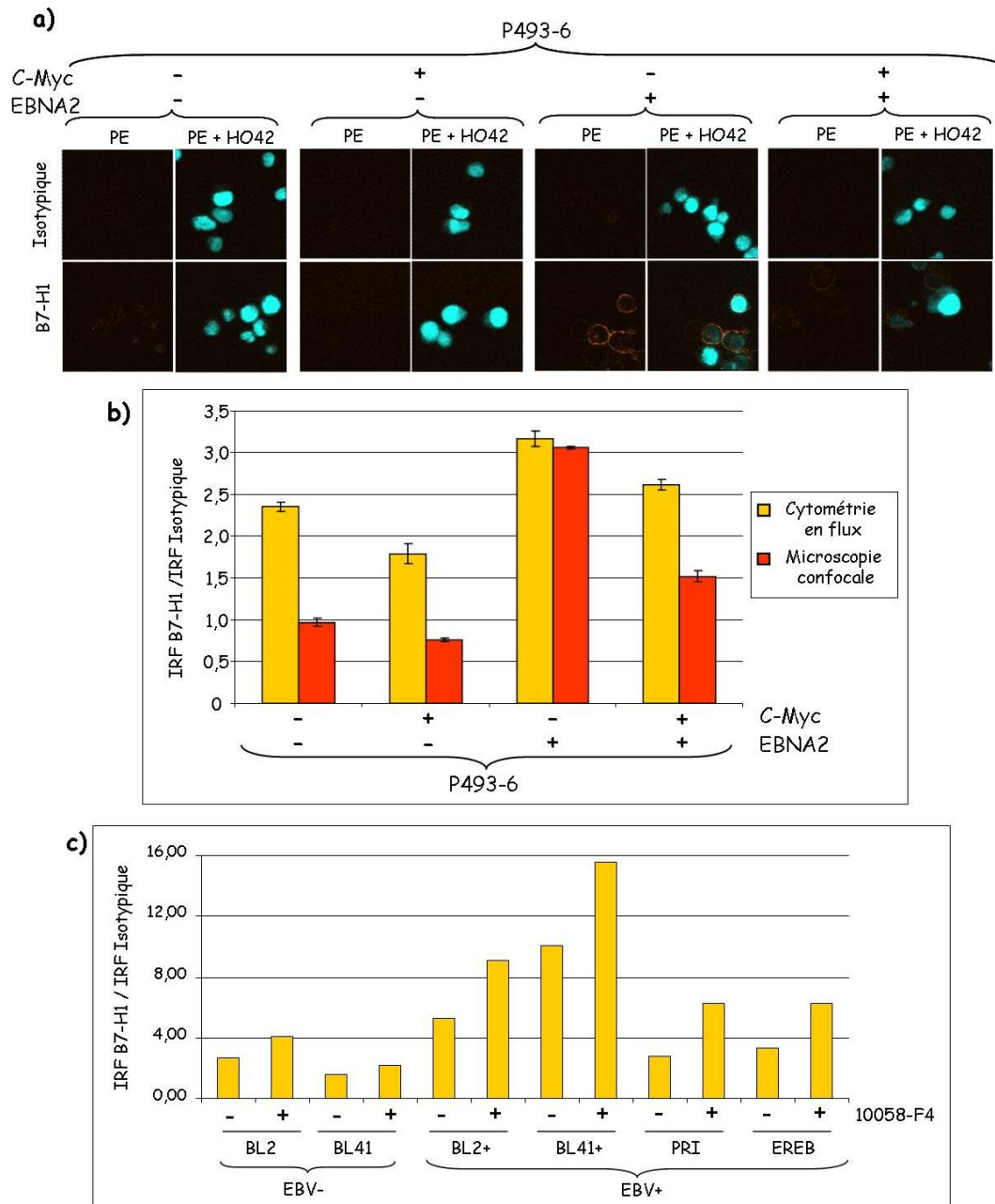


Figure 28 : Analyse de l'expression membranaire de B7-H1 en fonction de l'expression de *c-Myc*.

La lignée P493-6 a été cultivée pendant 48 heures en présence (Myc-) ou non (Myc+) de 100ng/ml de tétracycline et en présence (EBNA+) ou non (EBNA-) de 1µM d'astrogène.

a) : Analyse par microscopie confocale de l'expression membranaire de B7-H1. La première ligne représente les marquages avec le contrôle isotypique couplé à la PE et la seconde ligne le marquage avec l'anticorps anti-B7-H1 couplé à la PE. Pour chaque lignée, la première colonne représente les résultats obtenus en PE et la deuxième colonne, la superposition des marquages PE et Hoescht 33342 (HO42, marqueur nucléaire).

b) : Représentation graphique de l'expression membranaire de B7-H1 : analyse par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage B7-H1 et l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage avec le contrôle isotypique (soit IRF B7-H1/IRF Isotypique). Les barres d'erreurs représentent 4 expériences indépendantes en cytométrie en flux et 2 expériences indépendantes en microscopie confocale.

c) : Analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de B7-H1 suite au traitement des cellules (LCLs et BL EBV-/+) par un inhibiteur chimique de *c-Myc* (10058-F4 à 70µM pendant 48h). Les résultats sont exprimés par le rapport IRF B7-H1/IRF Isotypique.

Nous constatons que l'inhibition de c-Myc permet une augmentation de l'expression membranaire de B7-H1 dans les différentes lignées testées, indépendamment de l'EBV.

2.3.6. Non influence de c-Myc sur la quantité totale de protéine B7-H1 dans la cellule

Nous avons réalisé ensuite un marquage du contenu total (cytoplasmique et membranaire) de B7-H1 dans les cellules P493-6 suite à leur fixation et perméabilisation, selon les différentes conditions de culture pré-citées. Nous avons tout d'abord observé ce marquage en microscopie confocale (cf. **Figure 29a**). Puis nous avons quantifié les fluorescences afin d'exprimer l'expression totale relative de B7-H1 (IRF B7-H1/IRF Isotypique) (cf. **Figure 29b**). Les résultats obtenus nous indiquent que le contenu total de B7-H1 ne semble pas être influencé par la répression de l'expression de c-Myc (différences non significatives entre les conditions).

Nous observons là encore une plus forte expression totale de B7-H1 dans toutes les lignées par rapport à l'expression membranaire. Nous avons finalement quantifié cette expression totale par Western-blot, dont le contrôle de charge est l' α -tubuline. Les états On (+) et Off (-) de c-Myc et de LMP1 ont été vérifiés à l'aide des anticorps correspondants (cf. **Figure 29c**)

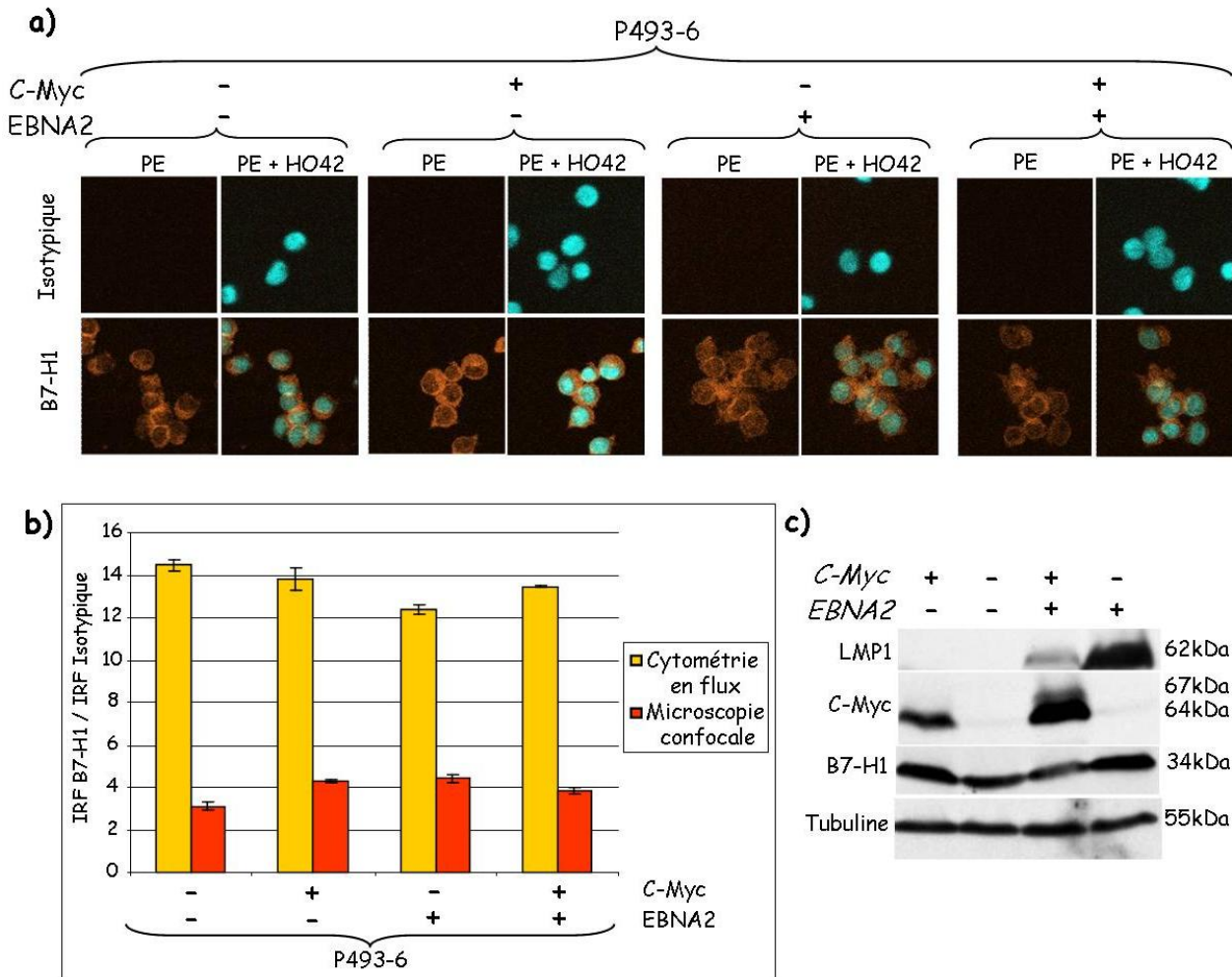


Figure 29 : Analyse de l'expression totale de B7-H1 par microscopie confocale, cytométrie en flux et Western-blot dans la lignée P493-6.

La lignée P493-6 a été cultivée pendant 48 heures en présence (Myc-) ou non (Myc+) de 100ng/ml de tétracycline et en présence (EBNA+) ou non (EBNA-) de 1µM d'œstrogène.

a) : Analyse par microscopie confocale de l'expression totale de B7-H1. La première ligne représente les marquages avec le contrôle isotypique couplé à la PE et la seconde ligne le marquage avec l'anticorps anti-B7-H1 couplé à la PE. Pour chaque lignée, la première colonne représente les résultats obtenus en PE et la deuxième colonne, la superposition des marquages PE et Hoescht 33342 (HO42, marqueur nucléaire).

b) : Représentation graphique de l'expression totale de B7-H1 : analyse par cytométrie en flux et par microscopie confocale. Les résultats sont exprimés par le ratio entre l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage B7-H1 et l'intensité relative de fluorescence émise par le marquage avec le contrôle isotypique (soit IRF B7-H1/IRF Isotypique). Les barres d'erreurs représentent 4 expériences indépendantes en cytométrie en flux et 2 expériences indépendantes en microscopie confocale.

c) : Analyse de l'expression de B7-H1 par Western-blot. C-Myc et LMP1 permettent de vérifier les états On (+) et Off (-) de c-Myc et de l'EBV. L'α-tubuline est le contrôle de charge.

Nos résultats confirment l'existence d'un pool intracytoplasmique de molécules B7-H1, non régulé par l'EBV (comme indiqué précédemment) ou par c-Myc.

Au final, *c-Myc* et l'*EBV* régulent réciproquement la transcription de *B7-H1* ainsi que son expression membranaire. De plus, l'expression protéique totale de *B7-H1* ne varie apparemment pas en fonction de la répression de *c-Myc* ou de la présence de l'*EBV*, suggérant une modulation de l'expression membranaire par externalisation.

2.4. Discussion

Le programme de prolifération associé à la latence III est gouverné par l'expression de la protéine EBNA2, qui à son tour induit l'expression des protéines EBNA3 et des protéines LMP. LMP1 est l'oncogène majeur du virus. Il promeut la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la progression tumorale. L'analyse fonctionnelle des nombreux gènes régulés par LMP1 suggèrent par ailleurs que cette protéine augmente l'immunogénicité des cellules infectées. Parmi les gènes régulés positivement par LMP1, on trouve les molécules de co-signalisation *B7-1* et *B7-2* (*CD80* et *CD86*) (Panagopoulos et al., 2004). Nous nous sommes intéressés à une autre protéine de la famille *B7* : *B7-H1*, molécule de co-signalisation de la réponse immune, impliquée dans l'échappement à la réponse immune des cellules tumorales ou chroniquement infectées.

Nous montrons que l'*EBV* régule positivement l'expression des ARNm *B7-H1*. Cette régulation transcriptionnelle est associée à une augmentation de l'expression de la protéine à la surface des cellules B *EBV+*. En revanche, toutes les lignées testées présentent une quantité protéique totale en *B7-H1* apparemment équivalente au sein de la cellule. Ces résultats suggèrent qu'il existe trois niveaux de régulation de *B7-H1* : le premier au niveau du gène ou de la stabilité des ARNm, le deuxième au niveau intracellulaire par constitution d'un *pool* intracytoplasmique, et le troisième par régulation de l'externalisation de cette molécule à la membrane.

D'après nos résultats, l'*EBV* régulerait l'expression de *B7-H1* au niveau transcriptionnel mais également au niveau membranaire. Ces observations sont relativement surprenantes. Alors que la latence III de l'*EBV* apparaissait comme un état immunogène, nous montrons qu'elle permet également l'expression d'une protéine de co-inhibition de la réponse immune, qui lorsqu'elle est exprimée à la membrane de la cellule cible, induit l'anergie ou l'apoptose des CTLs, *via* la liaison avec son récepteur *PD-1*.

Comme *c-Myc* est un des systèmes transcriptionnels cellulaire associé à la latence III et impliqué dans une baisse de l'immunogénicité des cellules de BL, nous avons cherché à voir si ce

facteur régule B7-H1. Notons que l'expression de B7-H1 est diminuée en ARN et à la membrane des deux lignées de BL EBV- testées. Nous avons utilisé le modèle cellulaire original P493-6, dont l'expression de *c-Myc* est régulable par la tétracycline et la protéine EBNA2 inducible par l'oestrogène. Nous montrons que *c-Myc* réprime l'expression de B7-H1, à la fois au niveau transcriptionnel et à la surface de la cellule. Dans ce modèle cellulaire, nous confirmons l'induction de B7-H1 par le programme de latence III de l'EBV. De plus, nous constatons la régulation négative de B7-H1 par *c-Myc*, que le programme de latence III soit induit ou non. La régulation négative de l'expression membranaire de B7-H1 par *c-Myc* a été confirmée sur les lignées LCLs et BL EBV- et EBV+ par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de *c-Myc*. A nouveau, notons que le niveau d'expression de B7-H1 total ne semble pas être affecté par la répression de *c-Myc*. Nous confirmons ainsi l'existence d'un *pool* intracytoplasmique de la molécule B7-H1. Dans l'hypothèse qu'il s'agisse de l'isoforme 1 membranaire, son externalisation serait régulée à la fois par *c-Myc* et par l'EBV, mais de manière réciproque.

Finalement, *c-Myc* régule également l'expression de B7-H1 au niveau transcriptionnel et membranaire. Ces résultats sont là encore relativement surprenants, puisque *c-Myc* est connu pour diminuer l'immunogénicité des cellules B (Schlee et al., 2007b).

Concernant la modulation transcriptionnelle de B7-H1, il est connu que le promoteur de B7-H1 contient un site de fixation pour NF- κ B et deux sites IRF, éléments de réponse aux interférons (Lee et al., 2006). Des expériences de gène rapporteur ont montré que LMP1 et LMP2a augmentent l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur *luciférase* lorsque celui-ci est placé sous le contrôle du promoteur de B7-H1 (Yamamoto et al., 2008). Ces deux observations montrent que l'EBV peut réguler de façon transcriptionnelle ce facteur. Cette régulation pourrait se faire par la voie NF- κ B directement (voie activée constitutivement dans les cellules EBV+ via LMP1), ou indirectement *via* STAT1 (protéine activée dans les cellules B EBV+) (Najjar et al., 2005). Nous savons également que *c-Myc* diminue la réponse aux interférons, en inhibant le facteur STAT1 (Schlee et al., 2007a). Ainsi, le rôle réciproque de *c-Myc* et de l'EBV dans la régulation transcriptionnelle de l'expression de B7-H1 pourrait être en rapport avec l'activation ou l'inhibition de STAT1. Cependant, nous n'avons pu moduler l'expression de B7-H1 sur les lignées BL EBV- par addition d'interféron- γ , activateur de STAT1 (résultats non présentés). Peut-être n'était-ce pas le bon type cellulaire, la stimulation exogène de STAT1 par la cytokine ayant été neutralisée par la sur-expression endogène de *c-Myc* dans ces cellules.

Concernant ensuite la régulation de l'expression de la protéine B7-H1, rappelons que trois isoformes sont décrites : l'isoforme 1 (membranaire), l'isoforme 2 (cytoplasmique) et l'isoforme 3 (dont la localisation n'est pas décrite). D'après le site <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZQ7>, les tailles attendues pour ces trois isoformes sont de 34 kDa (isoforme 1) et de 20 kDa (isoformes 2 et 3). Cependant, la taille apparente en Western-blot de l'isoforme 1 de B7-H1 donnée par le fournisseur de l'anticorps (<http://www.scbt.com>) ainsi que par certaines publications (Pinchuk et al., 2008) est proche de 50 kDa. Cette différence entre la taille théorique et la taille apparente en Western-blot peut résulter de modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation ou la phosphorylation, ou encore de la dénaturation incomplète de la protéine dans les conditions de migration utilisées. Nous avons retrouvé une bande spécifique de B7-H1 à 34 kDa avec l'anticorps H-130, d'une taille apparente en Western-blot plus petite que celle décrite dans la littérature. Il est donc possible que l'isoforme détectée en intracellulaire ne soit pas celle exprimée à la membrane. Il est aussi possible que notre technique de Western-blot soit un peu différente de celle utilisée par (Pinchuk et al., 2008) avec pour résultat une taille de l'isoforme 1 de B7-H1 plus proche de celle théoriquement prédite par la séquence en acides aminés.

Ainsi, comme l'anticorps utilisé permet de détecter théoriquement les isoformes 1 et 3 et que nous ne détectons qu'une seule isoforme, deux hypothèses peuvent être formulées : soit nous détectons l'isoforme 3 en intracellulaire. Il existerait alors deux *pools* de molécules B7-H1, un intracellulaire constant (isoforme 3) et un membranaire régulable (isoforme 1). Dans ces conditions, nous retrouvons une régulation cohérente aux niveaux génique et membranaire. La question du rôle de l'isoforme 3 en intracellulaire et de sa régulation différentielle par rapport à l'isoforme 1 se pose. La deuxième hypothèse serait que nous détectons l'isoforme 1 (isoforme membranaire) en intracellulaire. Nous pourrions alors supposer que les molécules B7-H1 membranaires proviennent d'un *pool constant* externalisé à la membrane en réponse à un signal. Mais, il nous faut alors expliquer pourquoi l'expression génique et membranaire de l'isoforme 1 est régulable, alors que son expression protéique en intracellulaire ne l'est pas. En l'état actuel de nos résultats, un argument est en faveur de la deuxième hypothèse. En effet, nous pensons que nous détectons l'isoforme 1 puisque nos extraits cellulaires sont des extraits totaux, ainsi, nous devrions donc retrouver deux bandes si la première hypothèse est juste. Cependant, cet argument ne tient que si l'anticorps reconnaît de façon égale les isoformes 1 et 3 de B7-H1 et ne présente pas d'affinité préférentielle par exemple pour l'isoforme 3. Il s'avère alors indispensable à ce niveau de tester d'autres anticorps en Western-blot.

Enfin, notons que concernant les résultats obtenus en Q-PCR, il ne nous est pas possible de distinguer quelles sont les isoformes concernées par la régulation transcriptionnelle *via* l'EBV et c-Myc, puisque la sonde utilisée en Q-PCR reconnaît les exons 1 et 2, donc les trois isoformes codées par le gène. Les prochaines analyses en Q-PCR devront être réalisées avec différentes sondes permettant de différencier la régulation transcriptionnelle affectant chacune de ces isoformes.

Ces différentes expériences nous amènent à observer que l'EBV et c-Myc réguleraient de façon réciproque l'externalisation de la molécule B7-H1. Si cette régulation est effectuée à partir d'un *pool* constant, il est alors important d'étudier par quels mécanismes se fait cet export à la membrane. Une question évidente qui se pose alors est de connaître la localisation de cette protéine. Pour l'instant les images obtenues par microscopie confocale ne nous permettent pas de discriminer une localisation particulière. Dans un premier temps, il sera nécessaire de vérifier si la répartition est effectivement homogène, en testant d'autres méthodes de perméabilisation que le triton X100, connu pour induire une fausse positivité diffuse intracellulaire par perméabilisation de l'ensemble du réseau des membranes. Ensuite, une perspective à court terme sera de réaliser des expériences de colocalisation de la protéine avec les organites intracellulaire, une fois ceux-ci isolés. Par exemple, l'identification des compartiments pourrait être réalisée par des marquages avec des anticorps dirigés contre des protéines de la matrice golgienne (GM130) ou du réseau trans-golgien (TGN38). L'étude des voies de recyclage est également intéressante. Les vésicules d'endocytose sont formées après invagination de la membrane plasmique et sont dirigées vers les endosomes de tri avec lesquels elles fusionnent. Dans ce compartiment s'effectue un tri sélectif entre les molécules qui seront dégradées (voie lysosomale) et celles qui seront recyclées vers la membrane plasmique via les endosomes de recyclage. Ainsi, il peut être intéressant de faire des marquages utilisant des anticorps dirigés contre le récepteur de la transférine (TfR, contenu dans les endosomes de recyclage) ou contre la protéine lysosomale LAMP-1. Ces quatre marquages pré-cités ont été réalisés dans une étude visant à localiser le récepteur PD-1 (Pentcheva-Hoang et al., 2007). Il serait donc intéressant de s'en inspirer afin de déterminer la localisation de B7-H1.

En outre, d'autres marquages peuvent être réalisés afin d'observer les mécanismes moléculaires du trafic vésiculaire de la protéine. Il s'agirait par exemple de marquer les coatomères COP. COPI est associé aux vésicules assurant les échanges intra-golgien ou le transport rétrograde du réticulum endoplasmique (RE) vers le golgi. COPII est impliqué dans le transport antérograde des protéines du RE vers le compartiment intermédiaire golgi/RE. Un marquage dirigé contre la

clathrine pourrait également s'avérer intéressant. En effet, les vésicules de clathrine transportent des protéines de la membrane plasmique et du réseau trans-golgien dans les endosomes tardifs. Tous ces modes de transport pourraient être observés par microscopie confocale, par des méthodes de colocalisation entre B7-H1 et une des protéines précédemment citées. De plus, si un trafic vésiculaire particulier est mis en évidence, il pourra être confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs permettant d'accumuler des protéines dans certains compartiments (comme la protéine VSV-G fusionnée à la protéine GFP) et de suivre son transport une fois l'inhibition levée par vidéomicroscopie à fluorescence par exemple. Deux inhibiteurs semblent intéressants pour effectuer ces études : la Bréfeldine A, inhibiteur du recrutement des COPI entraînant l'accumulation des protéines dans le golgi ; ou encore le Nocodazole, qui induit la dépolymérisation des microtubules et conduit au fractionnement du golgi.

Dans l'hypothèse où, quelles que soient les conditions de perméabilisation, la répartition de B7-H1 demeure homogène, il faudra recourir des méthodes de fractionnements cellulaires permettant de séparer les différents organites cellulaires pour effectuer ces mêmes expériences de co-localisation.

Notons une particularité liée à l'infection par l'*EBV*. Il s'agit de la sécrétion d'exosomes, vésicules issues des corps multivésiculaires (MBV- *Multivesicular Bodies*) (Thery et al., 2002). Une fois excrétées, ces vésicules sont riches en molécules du CMH de classe II et en molécules de co-stimulation et peuvent interagir avec le TCR, directement ou indirectement (via les CPA) (Morelli et al., 2004). Ces interactions aboutissent généralement à l'activation des cellules T mais elles peuvent aboutir également à un effet cytostatique sur ces cellules, voire à leur mort (Abusamra et al., 2005). Il a été montré que les exosomes sécrétés par les cellules *EBV*⁺ sont riches en protéines LMP1. Ces exosomes LMP1⁺ induisent l'anergie des cellules T avoisinantes, même suite à une forte stimulation CD3-CD28-TCR (Dukers et al., 2000; Flanagan et al., 2003; Keryer-Bibens et al., 2006). Récemment, une étude a mis en évidence le rôle de la galectine-9 (dont l'expression est augmentée suite à l'infection par l'*EBV*) lorsque cette molécule est exprimée par les exosomes sécrétés par les cellules issues de NPC-*EBV*⁺. *In vitro*, les exosomes-galectine-9, issus de plasma de patients atteints de NPC, induisent l'apoptose de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'*EBV*, via l'interaction galectine-9/Tim3 (Tim3 est un récepteur induisant la mort cellulaire, exprimé par les cellules Th1) (Klibi et al., 2009). Il paraît dès lors intéressant d'étudier ces microstructures d'origine endosomale, pouvant être isolées par des systèmes de capture utilisant des billes couplées

à des anticorps anti-HLA (Clayton et al., 2001). Par la suite, des marquages de la protéine B7-H1 pourraient être envisagés. Si la protéine B7-H1 est exprimée au niveau de ces structures, il faudra étudier son rôle dans l'immunomodulation associée à la sécrétion d'exosomes par les cellules B EBV+. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la sécrétion des exosomes restent cependant méconnus, il n'existe donc pas d'inhibiteurs spécifiques de leur sécrétion, permettant d'appréhender un rôle spécifique dans le cadre d'une réponse immune.

Suite à ces différentes remarques, la question des voies de signalisation impliquées dans l'externalisation de B7-H1 se pose. Nous savons que la stimulation à l'IFN γ ou avec des ligands du TLR augmente l'expression de B7-H1 à la surface de cellules issues de myélomes (Liu et al., 2007). Dans ce modèle, l'induction de B7-H1 passe par les voies MEK/Erk/STAT1 et MyD88/TRAF6. Récemment, une étude a montré que l'expression de B7-H1 dans les cellules de lymphome de Hodgkin et de lymphome anaplasique à grandes cellules, est également régulée par la voie MEK/ERK (Yamamoto et al., 2009). Plus spécifiquement, dans le cas des lymphomes anaplasiques cette expression passe par la voie NPM-Alk et dans le cas des cellules de HL par les voies Erk et p38 kinase. Or, LMP1 active la voie MAPK : la voie JNK via le recrutement de TRAF6 et la voie p38, via le recrutement de TRAF2 (Eliopoulos et al., 1999; Wan et al., 2004). Peu de données bibliographiques sont disponibles sur l'activation de la voie Erk, mais une étude récente a cependant montré que cette voie pouvait être activée par le recrutement de TRAF2 et TRAF3 (Dawson et al., 2008). Ainsi, il serait intéressant de voir si LMP1 induit l'expression de B7-H1 via la voie des MAPK, et ce par l'utilisation d'inhibiteurs tels que U0126 (inhibiteur de MEK1, inhibant la phosphorylation d'Erk), du SP600125 (inhibiteur de JNK) ou du SB203580 (inhibiteur de p38). L'implication de la voie PI3K pourrait être également étudiée, car elle est aussi activée par la protéine LMP1. Pour ce faire, la molécule inhibitrice LY294002 sera utilisée.

Comme évoqué auparavant, deux autres voies semblent intéressantes à étudier : la voie NF- κ B et la voie JAK/STAT. En effet, la voie NF- κ B est activée constitutivement par LMP1. Même si d'après les modèles déjà étudiés dans la littérature, elle n'apparaît pas intervenir (Liu et al., 2007; Yamamoto et al., 2009), nous pensons que la présence d'un site NF- κ B dans le promoteur de B7-H1 joue un rôle dans son expression. De même, la présence de sites IRF1 pose la question de l'implication de la voie JAK/STAT. Du fait de l'implication de c-Myc dans la régulation de l'expression de B7-H1, ces deux dernières voies (NF- κ B et JAK/STAT) paraissent d'autant plus intéressantes à étudier. En effet, nous savons que c-Myc diminue la réponse aux interférons et

régule négativement le facteur NF- κ B. Une hypothèse selon laquelle l'EBV régule positivement B7-H1 alors que c-Myc le régule négativement par la voie NF- κ B, *via* STAT1, paraît assez séduisante.

Nous disposons au laboratoire de constructions inductibles originales, qui sont épisomales et inductibles pour l'expression d'un ADNc d'intérêt (Bornkamm et al., 2005). Nous avons à notre disposition des vecteurs contenant les ADNc de LMP1, de ses mutants CTAR et de son dominant négatif LMP1-CT (Le Clorennec et al., 2008). La surexpression de LMP1 pourrait nous permettre d'observer son implication dans la régulation de l'expression de B7-H1, à confirmer par l'utilisation de son dominant négatif LMP1-CT qui, localisé dans le cytoplasme n'induit pas la signalisation LMP1 malgré la présence des domaines fonctionnels CTAR (Adriaenssens et al., 2004). Les deux mutants CTAR de LMP1 dont nous disposons sont mutés soit dans le domaine CTAR1, soit dans le domaine CTAR2 de la protéine. L'activation de la voie non-canonique de NF- κ B passe par le recrutement des protéines TRAF qui interagissent avec le domaine CTAR1 de LMP1, et l'activation de la voie canonique passe également essentiellement par le recrutement des protéines TRAF, mais *via* la protéine TRADD qui interagit avec le domaine CTAR2 de LMP1. Ainsi, l'utilisation des deux mutants CTAR de LMP1 nous renseignerait sur l'éventuelle activation de l'une ou l'autre des voies NF- κ B. Si cette voie est impliquée, nous pourrions étudier de façon plus précise le réel impact de l'une ou l'autre des voies NF- κ B sur l'expression de B7-H1, grâce à l'utilisation de ces mêmes constructions inductibles contenant les ADNc des différentes sous-unités de NF- κ B. Afin d'identifier un rôle de la voie JAK/STAT, nous disposons des vecteurs inductibles contenant l'ADNc de STAT1 α (Le Clorennec et al., 2006). Là encore, cette construction nous permettrait de mettre en évidence un rôle de cette voie par surexpression de ce facteur. De plus, s'il s'avère que le facteur STAT est impliqué dans la régulation de l'expression de B7-H1, ceci pourra être confirmé par l'utilisation de son dominant négatif STAT1 β . Enfin, l'implication de c-Myc pourrait être également appréciée à l'aide de ces constructions épisomales inductibles, puisque nous disposons de ces vecteurs originaux, contenant son ADNc, mais également deux de ses dominants négatifs : Myc Δ (délétion des acides aminés 40 à 178 donc de son domaine de transactivation) et MaxBR (délétion du domaine de liaison à l'ADN, mais toujours capable de s'oligomériser avec c-Myc) (Faumont et al., 2009b).

Finalement, une des clefs de la compréhension de l'impact de la modulation de l'expression de B7-H1 à la membrane des cellules par l'EBV et par c-Myc sera d'en apprécier le rôle dans la

réponse immune T cytotoxique anti-EBV. Il sera envisageable de trier par cytométrie en flux les cellules d'une LCL ou d'un BL EBV+ en fonction de leur expression de B7-H1 (B7-H1 négatives vs B7-H1 positives) et de les mettre en présence de cellules T activées pour observer le rôle de la protéine B7-H1 dans un contexte de réponse immune T allogénique (réaction MLR- *Mixed Lymphocyte Reaction*). Est-ce que les cellules B7-H1 positives entraîneront une diminution de la cytotoxicité, alors que les cellules B7-H1 négatives seront éliminées plus rapidement ? Ces mêmes expériences pourraient être réalisées en autologue en obtenant une LCL à partir d'un sujet sain d'une part, et en préservant en DMSO ses lymphocytes T d'autre part. En effet, pour l'instant, il est connu que le récepteur préférentiel de B7-H1 est le récepteur PD-1, et récemment B7-1 a été mis en évidence comme récepteur pour B7-H1, délivrant également un signal co-inhibiteur. Cependant, B7-H1 peut aussi avoir un rôle de co-stimulation vis-à-vis des cellules T naïves, lorsqu'il est exprimé à la surface des CPA, mais ce récepteur n'est pas encore identifié (Keir et al., 2008). Que se passera-t-il si l'expérience est faite à partir d'un sujet séronégatif ou séropositif pour l'EBV ?

Dans ces expériences *in vitro* de réponse T anti-EBV, B7-H1 pourrait engager en outre une voie de signalisation dans la cellule l'exprimant à la membrane. Des auteurs ont montré que l'engagement de B7-H1 exprimé à la membrane de cellules B EBV+ aboutit à la mort de la cellule via la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), l'expression de FasL et une activation de la voie JNK (Kim et al., 2008). Une mise en présence de cellules B EBV+ exprimant B7-H1 avec des cellules T pourrait donc nous fournir de nombreux renseignements.

Finalement, ces expériences nous permettraient de comprendre le rôle de la modulation de l'expression de B7-H1, réciproquement par *c-Myc* et l'*EBV*, dans le contexte d'une réponse immune T cytotoxique anti-EBV.

3. ELABORATION DE NOUVEAUX VECTEURS POUR L'ÉVALUATION DU POUVOIR TRANSFORMANT D'ONCOGENES ET L'ÉTUDE DE L'ACTIVITE DE REGIONS REGULATRICES : L'EXEMPLE DE C-MYC ET DE LA LCR 3'IGH.

3.1. Introduction

Le lymphome de Burkitt est caractérisé par une translocation chromosomique impliquant l'oncogène *c-myc* (chromosome 8) et l'un des trois loci des immunoglobulines (chromosomes 2, 8 ou 22). Dans 80% des cas, la translocation implique le locus IgH (t(8 ;14)) (Blum et al., 2004). Le gène *c-myc* transloqué est alors fortement exprimé alors que l'allèle normal est silencieux (Bernard et al., 1983; Nishikura et al., 1983). De plus, l'utilisation du promoteur et l'élongation transcriptionnelle est modifiée lors de telles translocations (Taub et al., 1982; Taub et al., 1984; Denny et al., 1985; Bentley and Groudine, 1986; Eick and Bornkamm, 1986). Ces observations ont permis de proposer l'hypothèse que des séquences régulatrices présentes dans le locus IgH dérégulent l'expression de l'oncogène et modifient sa transcription. L'activateur transcriptionnel E μ fut le premier candidat. Les souris transgéniques portant le gène *c-myc* sous le contrôle de cet élément développent des tumeurs à un stade pré-B (Adams et al., 1985). Des souris portant un chromosome artificiel de levure intégrant une portion de la région 5' du locus IgH et *c-myc* développent également des tumeurs, indépendamment de la présence de E μ (Butzler et al., 1997; Palomo et al., 1999). Ainsi, la région située en 5' du locus ne permet pas le développement de lymphomes B "matures", comme le lymphome de Burkitt (BL). Par ailleurs, il est intéressant de constater que cette région est perdue dans la plupart des cas de BL dits "sporadiques" ou "caucasiens".

Quatre éléments transcriptionnels situés en 3' du locus IgH et spécifiques du lignage B ont été identifiés chez le rat puis chez la souris : hs3a, hs1-2, hs3b et hs4 (Pettersson et al., 1990; Dariavach et al., 1991; Matthias and Baltimore, 1993; Michaelson et al., 1995). L'élément hs4 est actif tout au long du développement B alors que le quasi-palindrome composé des éléments hs3a, hs1-2 et hs3b semble plus actif aux stades B tardifs (Matthias and Baltimore, 1993; Michaelson et al., 1995; Chauveau and Cogne, 1996). Ensemble, ces quatre éléments forment une région de contrôle du

locus (LCR 3'IgH) et jouent un rôle dans le mécanisme de commutation de classe (CSR) (Madisen and Groudine, 1994; Laurencikienė et al., 2001; Pinaud et al., 2001). Ces mêmes éléments ont par la suite été décrits chez l'homme. Ils sont au nombre de trois et en aval de chaque gène α : Hhs3, Hhs1-2 et Hhs4, Hhs1-2 étant flanqué de régions répétées inversées. Ces éléments ont un profil d'activité similaire à celui observé pour les éléments murins (Chen and Birshtein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Comme chez la souris, il a été montré que ces éléments agissent en synergie, et que leur activité est d'autant meilleure que l'architecture palindromique endogène est conservée (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998; Hu et al., 2000). Enfin, l'élément Hhs1-2 présente un polymorphisme selon les individus, ce qui n'est pas le cas de Hhs3 et Hhs4 (Pinaud et al., 1997; Denizot et al., 2001; Guglielmi et al., 2004).

L'implication de ces éléments dans la dérégulation de l'expression de *c-myc* a été mise en évidence tout d'abord *in vitro*. Les auteurs ont montré que les éléments murins de la LCR 3'IgH induisent de façon synergique un fort niveau d'expression de *c-myc* et un changement d'utilisation du promoteur dans des lignées de BL et de plasmacytomes (Madisen and Groudine, 1994). Ce changement d'utilisation de promoteur de P2 à P1 est dû au site NF- κ B, présent dans Hs4 (Kanda et al., 2000). Par la suite, plusieurs modèles murins ont été élaborés, mimant la translocation observée dans le cas de BL sporadiques. Cependant, dans ces modèles, la dérégulation de l'oncogène ne pouvait être attribuée aux seuls éléments de la LCR 3'IgH, la structure chromatinienne environnante pouvant jouer un rôle (Park et al., 2005a; Park et al., 2005b; Wang and Boxer, 2005). Récemment, un modèle murin transgénique portant une seule copie du transgène *c-myc-LCR 3'IgH*, encadré d'isolateurs de la chromatine a été élaboré dans notre laboratoire. 75% des souris développent des tumeurs apparentées à un phénotype de BL (Truffinet et al., 2007). Les auteurs proposent alors que la LCR 3'IgH seule, isolée de l'environnement chromatinien, suffit à déréguler fortement l'oncogène *c-myc*.

Dans ce travail, nous avons voulu exploiter à la fois le concept de vecteur épisomal, tels ceux dérivés de la compréhension de la biologie du virus d'Epstein-Barr (EBV), et le concept de "régulateur d'oncogènes" pour construire un nouvel outil moléculaire dédié à l'étude de la transformation du lymphocyte B. Pour ce faire, nous avons construit de nouveaux plasmides combinant les vecteurs pHEBo (Yates et al., 1985) et la région LCR 3'IgH humaine comme régulateur, avec le promoteur pV_H comme cible. Les ADNc en aval du promoteur pV_H sont celui de la *luciférase* (vecteurs pHEBo-pV_H-Luc-LCR) afin d'apprécier l'activité transcriptionnelle de la LCR et celui de *c-Myc* (vecteurs pHEBo-pV_H-Myc-LCR), afin d'évaluer le pouvoir transformant de

cet oncogène sous la dépendance de la LCR. Ces vecteurs ont potentiellement un double intérêt : d'une part, "tester" le pouvoir oncogénique de n'importe quel ADNc dans les cellules B et d'autre part, étudier le rôle des facteurs transcriptionnels se fixant sur des éléments régulateurs dans ces mêmes cellules.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Construction des vecteurs

Afin de construire ces nouveaux plasmides, nous avons utilisé deux familles de vecteurs du laboratoire :

✓ Les vecteurs pGl3-pV_H : vecteurs comprenant les éléments régulateurs seuls ou en association : Hhs1-2 ; Hhs3 ; Hhs4 ; Hhs3,1-2,4 et le promoteur bidirectionnel pV_H (cf. **Figure 30a**) (Denizot et al., 2001).

✓ Le vecteur pRTS1 : vecteurs épisomaux inductibles stables (Bornkamm et al., 2005), dérivés du vecteur pHEBo (Yates et al., 1985). Ils sont organisés en cassettes fonctionnelles comprenant un gène marqueur (*EGFP* ou *NGFR tronqué*), un promoteur minimal du cytomégalo virus (CMV) bidirectionnel, associé à une cassette régulatrice contenant les sept séquences régulatrices de l'opéron tétracycline d'origine bactérienne (appelé promoteur Tet-O7) flanqué des sites *HindIII* et *SwaI*. Ils contiennent également le gène codant le facteur de transactivation rtTA (*reverse tetracycline transactivator*) flanqué des sites *NotI* et *SbfI*, dont l'interaction, conditionnée par la doxycycline, avec la séquence Tet-O7, permet l'expression d'un ADNc d'intérêt flanqué de deux sites *SfiI*. De plus, la présence de la séquence OriP de l'EBV ainsi que la protéine EBNA1 permet le maintien du vecteur à l'état épisomal dans la cellule. Enfin, ces vecteurs contiennent deux gènes de résistance à deux antibiotiques (Ampicilline et Hygromycine) permettant la sélection des cellules (cf. **Figure 30b**) (Bornkamm et al., 2005).

Nous avons également utilisé deux vecteurs de sous-clonage pBluescript modifiés par l'ajout d'un linker : le premier présent au laboratoire et contenant un site *SfiI*, nécessaire au sous-clonage des ADNc ; le deuxième réalisé pour sous-cloner les éléments régulateurs et modifié par l'ajout d'un site *SbfI*.

Afin de construire ces nouveaux vecteurs pHEBo-pV_H dits "pp", nous avons élaboré une stratégie de clonage à l'aide du logiciel *Clone Manager*©. Nous avons retiré le promoteur Tet-O7

(digestion par *SwaI* et *HindIII*, puis création d'extrémités franches) et l'avons remplacé par le promoteur pV_H (récupéré par digestion *HindIII* du pGL3-pV_H), (vecteur "pp-intermédiaire" ou "pp-int"). A partir de ce vecteur, nous avons généré le vecteur vide en supprimant la cassette *SfiI* contenant l'ADNc d'intérêt et la cassette Eμ-CAG-rtTA (sites *SbfI* et *NotI*). Nous disposons alors d'un vecteur contrôle vide : le vecteur pHEBo-pV_H (pp) (cf. **Figure 30c**).

En parallèle, nous avons inséré l'ADNc de la *luciférase* Firefly dans les sites *SfiI* du vecteur pp-int. Nous obtenons le vecteur "ppL-int". Du vecteur ppL-int, nous avons retiré la cassette insérée entre les sites *NotI* et *SbfI*. Nous obtenons alors le vecteur pHEBo-pV_H-Luc (ppL) qui constitue notre vecteur contrôle de l'activité basale du promoteur pV_H sur le gène de la *luciférase* (cf. **Figure 30d**).

A partir du vecteur ppL-int, nous avons cloné les différents éléments régulateurs à notre disposition dans les sites *SbfI* et *NotI* dans ce vecteur : Hhs1-2, Hhs3, Hhs4 et l'association des trois éléments Hh3,1-2,4., éléments obtenus à partir des vecteurs pGL3-pV_H (Denizot et al., 2001) et sous-clonés dans le vecteur pBS-*SbfI*. Nous avons tout d'abord obtenus les vecteurs pHEBo-pV_H-Luc-Hhs1-2 (ppL12), pHEBo-pV_H-Luc-Hhs3 (ppL3) et pHEBo-pV_H-Luc-Hhs4 (ppL4). Puis, le clonage des éléments combinés a été réalisé en effectuant une PCR longue distance de la cassette Hhs3,1-2,4 sur le vecteur pGL3-pV_H nous permettant de générer un site *SbfI* en 5' et un site *NotI* en 3' du produit PCR. Prenant avantage d'un site *NotI* entre les éléments Hhs3,1-2 et Hhs4, nous avons généré deux fragments. Le premier fragment, contenant les éléments Hhs3,1,2 encadrés par les sites *SbfI* et *NotI*, a été cloné dans le vecteur ppL-int et nous avons obtenu le vecteur pHEBo-pV_H-Luc-Hhs3,1-2 (ppL312). Le deuxième fragment, correspondant à l'élément Hhs4 encadré de deux sites *NotI* a été cloné dans le vecteur ppL312 digéré au préalable par *NotI*. Ainsi, nous avons obtenu le vecteur pHEBo-pV_H-Luc-Hhs3,1-2,4 (ppL3124), avec l'élément Hhs4 en aval des deux éléments déjà présents. (cf. **Figure 30e**).

Une fois la série de vecteurs ppL contenant le gène de la *luciférase* obtenus, les mêmes vecteurs ppM ont été générés par clonage de l'ADNc de c-Myc marqué de la séquence peptidique HA aux sites *SfiI* en lieu et place de l'ADNc de la *luciférase* pour chacun des variants ppL. Nous avons alors obtenus les vecteurs pHEBo-pV_H-Myc (ppM), pHEBo-pV_H-Myc-Hhs1-2 (ppM12), pHEBo-pV_H-Myc-Hhs3 (ppM3), pHEBo-pV_H-Myc-Hhs4 (ppM4), pHEBo-pV_H-Myc-Hhs3,1-2 (ppM312) et pHEBo-pV_H-Myc-Hhs3,1-2,4 (ppM3124) (cf. **Figure 30d et e**).

Les vecteurs ont été vérifiés par séquençage, selon la méthode des didéoxynucléotides (Sanger et al., 1977).

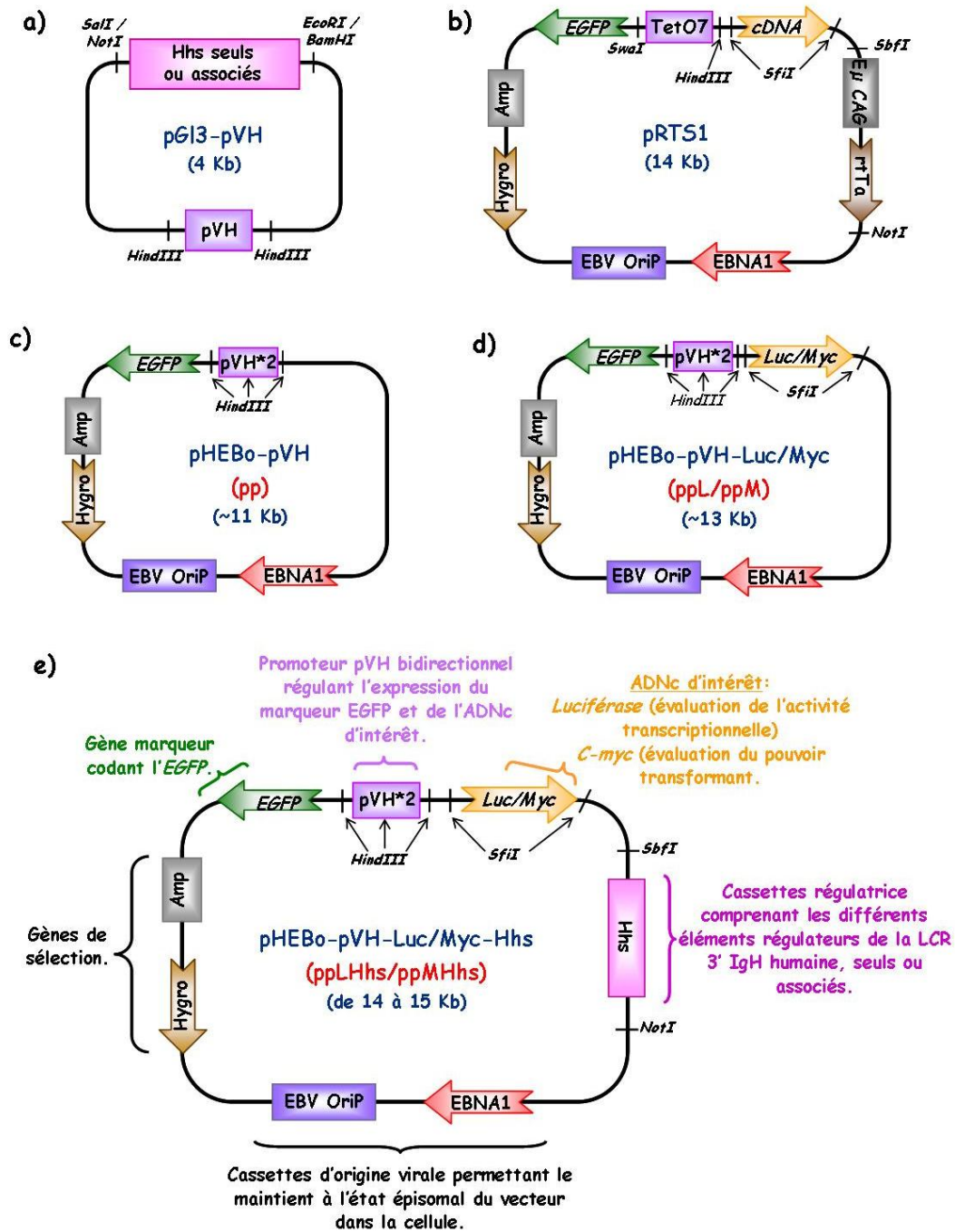


Figure 30 : Les vecteurs pGI3-pV_H, pRTS1 et pHEBo-pV_H-Luc/Myc-Hhs.

a) : Squelette du vecteur pGI3-pV_H, contenant le promoteur pV_H cloné entre deux sites HindIII et les éléments Hhs seuls (entre les sites BamHI et NotI) ou associés (entre les sites SalI et EcoRI).

b) : Squelette du vecteur pHEBo, contenant le promoteur Tet-O7 cloné entre les sites SwaI et HindIII, un ADNc d'intérêt cloné entre deux sites SfiI et une cassette rtTA clonée entre les sites NotI et SbfI régulant en association avec la doxycycline le promoteur Tet-O7, ainsi que des gènes de résistance à deux antibiotiques (Ampicilline et Hygromycine), et une cassette EBNA1 d'origine virale, permettant le maintien du vecteur à l'état épisomal dans la cellule.

c) : Squelette du vecteur pHEBo-pV_H contrôle (sans ADNc ni éléments régulateurs).

d) : Squelette des vecteurs pHEBo-pV_H-Luc/Myc, contenant le pV_H et les ADNc d'intérêts sans éléments régulateurs.

e) : Squelette du vecteur pHEBo-pV_H-Luc/Myc-Hhs, contenant deux promoteurs pV_H clonés en tandem grâce aux sites HindIII, l'ADNc du gène de la luciférase ou de c-Myc cloné entre les sites SfiI, les éléments Hhs seuls ou associés clonés entre les sites SbfI et NotI, le marqueur EGFP, les gènes de résistance aux antibiotiques Ampicilline et Hygromycine et enfin, les cassettes EBV-OriP et EBNA1 de l'EBV.

3.2.2. Culture cellulaire et transfections

Les lignées cellulaires PRI, 1602 et EREB2-5 (LCLs) ont été cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) et les fibroblastes sauvages exprimant le CD40L dans du DMEM (Gibco BRL-Life Technologies), additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et dépourvu de tétracycline (D. Dutscher, Brumath, France), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2mM de l-glutamine (Gibco BRL-Life Technologies), sous atmosphère humide, dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Les fibroblastes exprimant le CD40L ont été cultivés en présence de G418 (0.5 mg/ml). La lignée EREB2-5 est une LCL contenant une protéine chimérique EBNA2-récepteur à l'œstrogène. Le programme de prolifération associé à la latence III peut être ainsi réversiblement induit ou réprimé par l'ajout ou le retrait d'œstrogène (1 µM) dans le milieu de culture (Kempkes et al., 1995).

Les transfections stables ont été réalisées sur 10 millions de cellules, incubées avec 10 µg de vecteurs, pendant 15 minutes dans une cuve adéquate. Les cellules subissent une électroporation (choc de 250 V, capacitance de 950 µF ; Bio-Rad, CA), puis sont reprises à une densité de 1 million de cellules/ml. Après 3 jours, les cellules sont remises à une densité de 400 000 cellules/ml et sont sélectionnées par l'hygromycine (300 µg/ml) (Calbiochem, La Jolmla, CA). Les différentes expériences ont par la suite été réalisées au minimum après quatre semaines de sélection par l'hygromycine.

Les inducteurs utilisés sont l'Il-2 (2 ng/ml), l'Il-12 (2 ng/ml) (Peprotech, France), l'Il-4 (50 ng/ml), l'Il-6 (2 ng/ml), l'Il-10 (50 ng/ml) (R&D Systems, USA, MN)), le TNF-α (100 UI/ml ; Invitrogen) et l'IFN-γ (250 UI/ml ; Roche Diagnostics, France). La stimulation par le CD40L a été réalisée grâce à l'utilisation d'une lignée de fibroblastes exprimant de façon stable la molécule CD40L à leur surface (Garrone et al., 1995). Les fibroblastes CD40L sont traités par la mytomicine 4h avant leur mise en présence avec les cellules lymphoïdes, à raison de 5.10⁴ fibroblastes pour 5.10⁶ lymphocytes. 24 heures après stimulation, les cellules lymphoïdes sont prélevées et lavées. Le témoin de l'expérience consiste à mettre en présence des cellules lymphoïdes avec des fibroblastes sauvages.

3.2.3. Analyse et tri cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules transfectées ont été analysées directement par cytométrie en flux (car le vecteur contient le marqueur EGFP), avec un cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), canal FL1, et les résultats traités à l'aide du logiciel BD CellQuest Pro.

Le tri cellulaire a été réalisé par cytométrie en flux avec un cytomètre Facs Vantage Diva SE (Becton Dickinson, USA). Le logiciel associé est BD FACS Diva.

3.2.4. Activité luciférase

Cinq millions de cellules ont été prélevées, lavées en tampon PBS à 4°C, puis lysées dans du PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega, France) pendant 20 minutes à température ambiante. L'activité luciférase a été mesurée sur 10 µl d'échantillon (soit 100 000 cellules) à l'aide du kit *Luciferase Assay System* et du luminomètre Turner Designs TD 20/20 (Promega).

3.2.5. Western-blot

Les extraits protéiques ont été réalisés à partir de 10 millions de cellules lavées dans du PBS et repris dans 100 µl de tampon de lyse Blue Laemmli, additionné de 5% de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad). Les lysats ont été soumis aux ultra-sons, centrifugés et conservés à -20°C. Le Western blot a été réalisé comme précédemment décrit (Le Clorennec et al., 2006). Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-Tag-HA (clone 6E2, dilué au 1/1000^{ème}, Cell Signaling Technology, CA), anti-c-Myc (clone 9E10, dilué au 1/200^{ème}, Santa Cruz Biotecnologie), anti-LMP1 (clone S12, dilué au 1/100^{ème}, issu d'un hybridome) et anti-α-tubuline (clone B5.2.1, dilué au 1/10 000^{ème}, Sigma-Aldrich). L'anticorps secondaire (Ac de chèvre anti-souris) couplé à la peroxydase a été incubé pendant 45 minutes à température ambiante (dilués au 1/5000^{ème}, Bio-Rad). La révélation a été effectuée par chimiluminescence à l'aide du kit ECL+ (Amersham, Orsay, France) puis par autoradiographie (films X-Omat R, Sigma-Aldrich).

3.3. Résultats

3.3.1. Un nouvel outil moléculaire : les vecteurs pHEBo-pV_H

3.3.1.1. Principe d'élaboration des vecteurs

Nous avons élaboré une nouvelle série de vecteurs en se basant sur les pré-requis suivants :

✓ La LCR 3'IgH doit être en 3' de l'ADNc d'intérêt, qui sera soit le gène rapporteur *luciférase* ("*Luc*"), soit l'oncogène *c-myc*.

✓ La présence d'un marqueur nous permettant de suivre l'efficacité de transfection par cytométrie en flux : l'EGFP.

✓ Un promoteur bidirectionnel, modulé par la LCR 3'IgH et spécifique du lignage B, contrôlant à la fois l'expression du marqueur fluorescent et de l'ADNc d'intérêt. Nous avons choisi le promoteur pV_H décrit par (Doyen et al., 1989).

✓ Une expression stable de ces vecteurs sans intégration dans le génome afin d'éviter les effets de position.

La description de la fabrication des vecteurs est donnée dans le paragraphe "Construction des vecteurs" du "matériels et méthodes" (cf. **3.2.1**). Ils sont schématisés en **Figure 30** et répertoriés dans le tableau ci-après (cf. **Tableau 5**).

	pHEBo-pV _H : pp	
	<u>Luciférase :</u> pHEBo-pV _H -Luc : ppL	<u>c-Myc :</u> pHEBo-pV _H -Myc : ppM
Hhs1-2	pHEBo-pV _H -Luc-Hhs1-2 : ppL12	pHEBo-pV _H -Myc-Hhs1-2 : ppM12
Hhs3	pHEBo-pV _H -Luc-Hhs3 : ppL3	pHEBo-pV _H -Myc-Hhs3 : ppM3
Hhs4	pHEBo-pV _H -Luc-Hhs4 : ppL4	pHEBo-pV _H -Myc-Hhs4 : ppM4
Hhs3, 1-2	pHEBo-pV _H -Luc-Hhs3,1-2 : ppL312	pHEBo-pV _H -Myc-Hhs3,1-2 : ppM312
Hhs3, 1-2, 4	pHEBo-pV _H -Luc-Hhs3,1-2,4 : ppL3124	pHEBo-pV _H -Myc-Hhs3,1-2,4 : ppM3124

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents vecteurs construits.

La première colonne rappelle les différents éléments Hhs utilisés (seuls ou combinés). Les deux colonnes suivantes identifient les ADNc associés (luciférase ou c-Myc). En rouge, sont notées les abréviations attribuées à chacun des vecteurs en fonction de l'ADNc et du (des) élément(s) concerné(s), reprises par la suite dans le manuscrit.

Nous disposons donc d'un vecteur contrôle vide, le vecteur pp, de 5 vecteurs ppL-Hhs et de 5 vecteurs ppM-Hhs, ainsi que de leurs contrôles.

3.3.1.2. Vérification et description des inserts

Après chaque étape de clonage, les différents inserts ont été séquencés.

✓ Le promoteur pV_H : Les promoteurs des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines dirigent la transcription seulement dans les cellules du lignage B, même s'ils sont associés avec des

éléments régulateurs pouvant être actifs dans d'autres types cellulaires. Ces promoteurs contiennent un élément UPE (*Upstream Promoter Element*) en amont du promoteur, ayant pour séquence consensus : ATGCAAATNA (ici, N = A). Cet élément associé à la boîte TATA est nécessaire et suffisant pour l'activité du promoteur dans les cellules B et peut être la cible de BSAP. Ce promoteur contient en plus de la boîte TATA "physiologique", une boîte TATA-like en amont de l'élément UPE (cf. **Figure 31a**). Les deux boîtes TATA encadrant ainsi l'élément UPE, permettent à ce promoteur pV_H441 de conduire la transcription de façon bidirectionnelle (Doyen et al., 1989).

✓ **L'élément Hhs1-2** : En 1997, trois équipes ont mis en évidence l'élément Hhs1-2 en aval de chaque gène α (Chen and Birshstein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Selon les auteurs, la description et le séquençage de cet élément diverge, mais une des caractéristiques communes aux trois descriptions est que l'allèle $\alpha 2$ se trouve en orientation inversée par rapport à l'allèle $\alpha 1$. Nous travaillons à partir du matériel issu du laboratoire et donc nous retenons la description de la séquence de Hhs1-2 faite par (Pinaud et al., 1997). Ainsi, dans le *core* de Hhs1-2 (130 pb) sont retrouvés les sites Oct et AP-1. En amont du *core* se situe la région répétée constituée de 44 pb contenant un site μ E1 et un site NF- κ B. L'allèle $\alpha 1$ contient un motif répété et l'allèle $\alpha 2$ en contient 4. Cette région est flanquée de deux régions riches en G. Enfin, le site NF- α P n'est que partiellement conservé alors que les sites BSAP ne sont pas retrouvés. En 2001, les mêmes auteurs ont remarqué le polymorphisme relatif à Hhs1-2 et ont décrit 3 allèles Hhs1-2 $\alpha 1$: $\alpha 1a$, $\alpha 1b$ et $\alpha 1c$, contenant respectivement 1, 2 et 3 motifs répétés. De plus ces allèles peuvent parfois contenir cette répétition en orientation inverse (discriminée par le symbole '), mais l'orientation ne semble pas jouer de rôle (Denizot et al., 2001). Dans l'étude présentée ici, l'élément Hhs1-2 est celui correspondant à l'allèle $\alpha 1a$ (cf. **Figure 31b**).

✓ **L'élément Hhs3** : Cet élément a été mis en évidence la même année par deux équipes dont celle de Michel Cogné. Là encore les séquences décrites par les deux auteurs diffèrent mais ils s'accordent néanmoins sur la présence de trois principaux sites de fixation pour des facteurs de transcription, à savoir : μ E2, μ E5 et AP-1 (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Hhs3 $\alpha 1$ et Hhs3 $\alpha 2$ divergent de deux bases en position 209 et 378, pour $\alpha 1$: C et A ; pour $\alpha 2$: T et G (Mills et al., 1997). Nous disposons de l'élément Hhs3 $\alpha 2$. Le *core* est constitué d'une région de 192 pb (bases 214 à 406) (cf. **Figure 31c**) (Pinaud et al., 1997).

✓ **L'élément Hhs4** : Cet élément est constitué d'un *core* de 146 pb. Hhs4 $\alpha 1$ et Hhs4 $\alpha 2$ sont identiques et une séquence de fixation pour les facteurs NF- κ B et pour Oct sont décrites (Mills et al., 1997) (cf. **Figure 31d**).

a) Séquence du promoteur pV_H

```

5' AAGCTTGAAA ACCTCAGAGG ATTTGTCATC TCTAGGCCTG CTCAGTAGAG GTTGCATATAT AGCAGGGAAA CATGCAAATA
   -30          +1
AGGCCTCTCT CTTCTCATGA AAACGAGTCC TGAACTAACC TTGAATCTGA AGCAAAGGGG ATCAGCCCGA GATTCTCATF
   -70          +1
CAGTGATCAA CACTGAACAC ACATCCAAGC TTGAAAACCT CAGAGGATTT GTCATCTCTA GGCCTGCTCA GTAGAGGTTG
   -30          +1
CTATATAGCA GGGAAACATG CAAATAAGGC CTCTCTCTTC TCATGAAAAC GAGTCCTGAA CTAACCTTGA ATCTGAAGCA
AAGGGGATCA GCCCGAGATT CTCATTCACT GATCAACACT GAACACACAT CCAGCTT 3'
    
```

b) Séquence de l'élément Hhs1-2a1a

```

1 5' CTCTCTGAAC AGTGGGGACC ACCAGGCCAT GAGGGTGGGG GAGGTGCGGG CCTGCACCAG ACAGGCCCTG TACCAATCGG
81 GCTGCCTGTG CCCAGGCCAC CAGGGCCACC TCCGCTCAGC CTCCTTGGGG CTTCTGGGGT GGGGGTTGGC TGGGGCCCTT
161 GCCAGCGTTG GCTCCCTGTC CCTTCTCTGC AACCTGGGGG CTGCCCTGGT GTCTTGGTCC CAAAGATGGC AACAAAGTTCA
241 GAACCACCTGA ATTCATTAAG TTGACGTTTG CAGGGTGGTC CAGTGTCTAGT AACCCAAAGTG GGCCTGTCTCT GGGGGAGGGG
321 GCGGGTGTCC CCGAATCTGG AGGCCTGAGC CAGCCTGGGC ACGCTGGGGG AGGGGGCGGG AGAATCGTGC AAGCTATTTT
401 TGGAACAGC CTCAGAGGGC GAGAAACATG TTTTCGGTGT GGAACAAACA ACCATTGCA TGTGCCCTGA GGGCCAAGTC
481 TGCCCAAGAT GAGTCACTCA AGGAGAAACA GATCAGAGCC CTCACACCTG CCTGGGGGAG GGGTGGGGCG CGCTCCAGGG
561 ACCTGCTGTT GGGCCAGAG ATGCCGAAAA CTCAGCCAC CCGGCCGCCA TGGCAGGACC CACTTTCTCT ACCAGCTTGC
641 CCTTAGGTGG GACCCACAG ACCCTGGGA AGCCCTCAGC AGCCCTTGGG CAGGTCCAC CCTGCAGAGA ACGCCAAGGC
721 TCAAAGGCC ACTCGGGCTG AGACCTCAGG GAGCCCTGGG CCGCTTGGAT GCAGAGCCCT GAGGCCCGAG GCTAGGCTGT
801 GGGAGGGAGC AGCAGTGAGA CCCCCACTGG CCTCAGGGC TCACAGGTGC CCCGGTGAGG GTGCAGGGAG CGGGGTGGC
881 TGCCAAAGCAG GAAGGCGGAG GGCCAGGCT GCGTGGCAC CATCGGGCA CACTATGTGT CACTGGCCCA AAGGAGACTC
961 GCCCATGAGG AGCTGCTGCT GGTGG 3'
    
```

c) Séquence de l'élément Hhs3 a2

```

1 5' TTGCTCCAT TCTTCCAGGC TCAGAGGGGT GTGTAGGCC CAGGAGGACT TGGTGGGGAG AAGACCAGCC CAGGCCCTGT
81 GAGCTACACC CAGCCCCAGC CCTAAGGGG TCGCCAGGTC TCGACTTAGC ACTGGGGAGG GGGTACAGTA CAGGAGTGGG
161 GACAGGAAGG TGAGGGGAGG CCATGCCGTT TGTATTCTCT TGCTTTCTC TCTCTCCTGA AGCCTCTTGA ATAGACCTGC
241 AGAARTACCC AAAATAGCCC TGTGGGTGGG CTGAGTCATT GTGAACACAG CCCAGTCCAG GTTCTCCAGC CAGAGAACTG
321 CTGTTCTGAG AAACATGCC CAAAACCGAG ACCTGCCCAG GTGTGCCTGG GGCCTGAGCG AGGGGCTGCA GCCACAGGTA
401 GGCCCAAGCC CAACCAGCCC AGAGTCAGCT AGGGCTTTCC AGGTCCAGGG TTAGGCAGAG GTCAGCCAGG GTCACACCAG
481 GTCTATCTGA GGGGAGAGAC AAGAGACACA GAGACATAGA GAGAGAGAGA CAGGGATGGG GAGAGACAAG AGAGACAGGA
561 AAGGAGAGAC AAAGACAGAC ACAGAGAGAG AGATGGGGAT GGAGAGAGAT AAGAGACAGG GACAGGGAGG GACAGAGGCC
641 AGGCCAGTGA CAGAGACAGA GTTACAAGAG ACAGAAAG 3'
    
```

d) Séquence de l'élément Hhs4

```

1 5' CCCCACTCAG GAGGCTGGAC AACTAGCAG GTGGGGGGGC CGCAGCTCCC CCTCCCCAC CCCCGTCCAG TCTGAAAAAC
81 AAGACCTCAT GGGCACCGGG CCGCAGTCTC CACCCCCACC CCACCACACA GGCACAAACA CATCTTTGCA AATATTTCTA
161 AAAATGCTGA AAATGGGAAC CACAGAGCAG GTGGGACAGT GGTGTGGAAA CCCACCCCA CCTCCGAGAT GGGGATTTGC
244 ATTGGGGGAG GTGGGGGGAA GGCTGGCACC CAGGCAGCTG GTTTGCAAGG TTCCTGACTA TTCACACTCC CCAGCCACAC
321 CCCATGTCCA GGCCAAATGCT GTGGCCAGGC CCAGAGTGAC C 3'
    
```

Figure 31 : Séquences du promoteur pV_H et des éléments Hhs1-2a1a, Hh3a2 et Hhs4.

a) : Séquence du promoteur pV_H cloné en tandem entre deux sites HindIII (AAGCTT). Les séquences UPE (ATGCAAATA) sont encadrées par une boîte TATA (TATATA) et une boîte TATA-like (ATGAAA). La numérotation indique le site principal d'initiation de la transcription, représenté par une flèche.

b) : Séquence de l'élément Hhs1-2a1a. En rose, sont représentés les oligos de séquençage (ep19 et ep9) ; en bleu, le "core" de l'élément ; en italique-gras, les régions riches en G ; en encadrés, les séquences de fixation pour des facteurs de transcription (de 5' vers 3' : NF-κB, μE1, Oct, Ets et AP-1).

c) : Séquence de l'élément Hhs3a2. En rose sont représentés les oligos de séquençage (ep15bis et ep18) ; en bleu, le "core" de l'élément ; en rouge, les deux bases qui diffèrent entre Hhs3a1 (C et A) et Hhs3a2 (T et G) ; en encadrés, les séquences de fixation pour des facteurs de transcription (de 5' vers 3' : AP-1, μE2 et μE5).

d) : Séquence de l'élément Hhs4. En rose sont représentés les oligos de séquençage (5' Hhs4 et 3' Hhs4) ; en bleu, le "core" de l'élément ; en encadrés, les séquences de fixation pour des facteurs de transcription (de 5' vers 3' : NF-κB et Oct).

3.3.2. Synergie entre les éléments régulateurs

Dans un premier temps, nous avons validé les deux séries de vecteurs par transfection dans des lignées cellulaires. Nous présentons les résultats concernant les LCLs PRI et EREB2-5 transfectées stablement avec les vecteurs ppL et ppM, après sélection à l'hygromycine. La série de vecteurs ppL-Hhs a été validée par luminescence et par cytométrie en flux. La série de vecteurs ppM a été validée par Western-blot et par cytométrie en flux. D'une façon générale pour les deux lignées, nous confirmons que les éléments présentent une synergie lorsqu'ils sont combinés.

3.3.2.1. Lignée PRI (LCL)

Pour la lignée PRI transfectée avec les différentes constructions, nous observons une corrélation entre l'activité luciférase et la fluorescence émise par l'EGFP pour les vecteurs ppL-Hhs d'une part, et une corrélation entre l'expression de c-Myc-HA et la fluorescence émise par l'EGFP pour les vecteurs ppM-Hhs d'autre part (cf. **Figure 32**).

Le promoteur pV_H présente une activité basale, activité qui est nettement augmentée lorsque les différents éléments Hhs lui sont associés, tant en terme d'activité luciférase (cf. **Figure 32a**, t-test, $p < 0.001$) qu'en terme d'expression de l'EGFP (cf. **Figure 32b**). L'activité transcriptionnelle des éléments pris séparément n'est pas très différente tant pour l'activité luciférase que pour l'expression de l'EGFP (cf. **Figure 32a et b**). Seul Hhs4 présente une activité un peu supérieure ($p < 0.05$). Par contre, l'action des éléments combinés permet une nette augmentation de l'activité transcriptionnelle. La combinaison Hhs312 ou Hhs3124 ne change pas significativement les résultats. Ainsi, l'élément Hhs4 ne semble pas avoir d'effet supplémentaire, alors que, Hhs4 seul présente une meilleure efficacité transcriptionnelle que Hhs3 et Hhs1-2 (cf. **Figure 32a et b**). Notons que les résultats obtenus en cytométrie permettent d'évaluer le pourcentage de cellules portant le vecteur mais témoignent également de l'activité transcriptionnelle de par l'intensité de fluorescence.

Concernant la lignée PRI transfectée avec les vecteurs ppM-Hhs, de la même façon, nous observons une corrélation entre l'expression de c-Myc-HA et la fluorescence émise par l'EGFP (cf. **Figure 32c et d**). Cependant, le pourcentage de cellules EGFP positives est moindre comparé aux vecteurs ppL contenant les mêmes éléments (cf. **Figure 32b et d**). Nous avons vérifié en Western-blot l'expression de c-Myc (endogène et provenant du transgène) en utilisant comme contrôle de dépôt l'expression des protéines α -tubuline et LMP1 (cf. **Figure 32c**). L'ADNc de c-Myc cloné dans nos vecteurs est combiné à une séquence de marquage peptidique HA et conduit à l'expression

d'une protéine c-Myc-HA de 67 kDa (Hermeking et al., 1994). A l'aide d'un anticorps dirigé contre cette séquence peptidique, nous pouvons observer l'expression de la protéine c-Myc-HA dans les cellules transfectées. Ainsi, nous observons que les cellules transfectées avec le vecteur ppM expriment faiblement c-Myc-HA, témoignant de l'activité basale du promoteur pV_H. L'ajout des éléments Hhs3 ou Hhs4 seuls permet une augmentation de son expression, ce qui n'est pas le cas de Hhs1-2. Ces résultats sont à corrélérer à la fluorescence émise en EGFP (cf. **Figure 32c et d**). Comme précédemment observé pour les vecteurs ppL-Hhs, l'association des éléments Hhs permet une augmentation de l'expression de c-Myc-HA corrélée à une augmentation du nombre de cellules exprimant l'EGFP (cf. **Figure 32c et d**).

Nous avons par ailleurs mesuré l'expression de c-Myc endogène par Western-blot (cf. **Figure 32c**). Nous observons que les cellules PRI (non transfectées) expriment les deux formes de c-Myc (Myc1 p67 et Myc2 p64), avec une prédominance pour la forme p64. D'une façon générale, les cellules expriment majoritairement la forme p64 ; l'expression de la forme p67 est associée à un changement d'utilisation du promoteur de P2 à P1, phénomène observé dans les cas de BL. Lorsque les cellules sont transfectées avec les vecteurs ppM, nous observons un changement dans le profil d'expression des deux formes de c-Myc. Cependant, dans les lignées transfectées, il ne nous est pas possible de discriminer le niveau d'expression de la forme endogène p67. En effet, cette dernière présente la même masse moléculaire que la protéine c-Myc-HA issue des vecteurs ppM. (cf. **Figure 32c**).

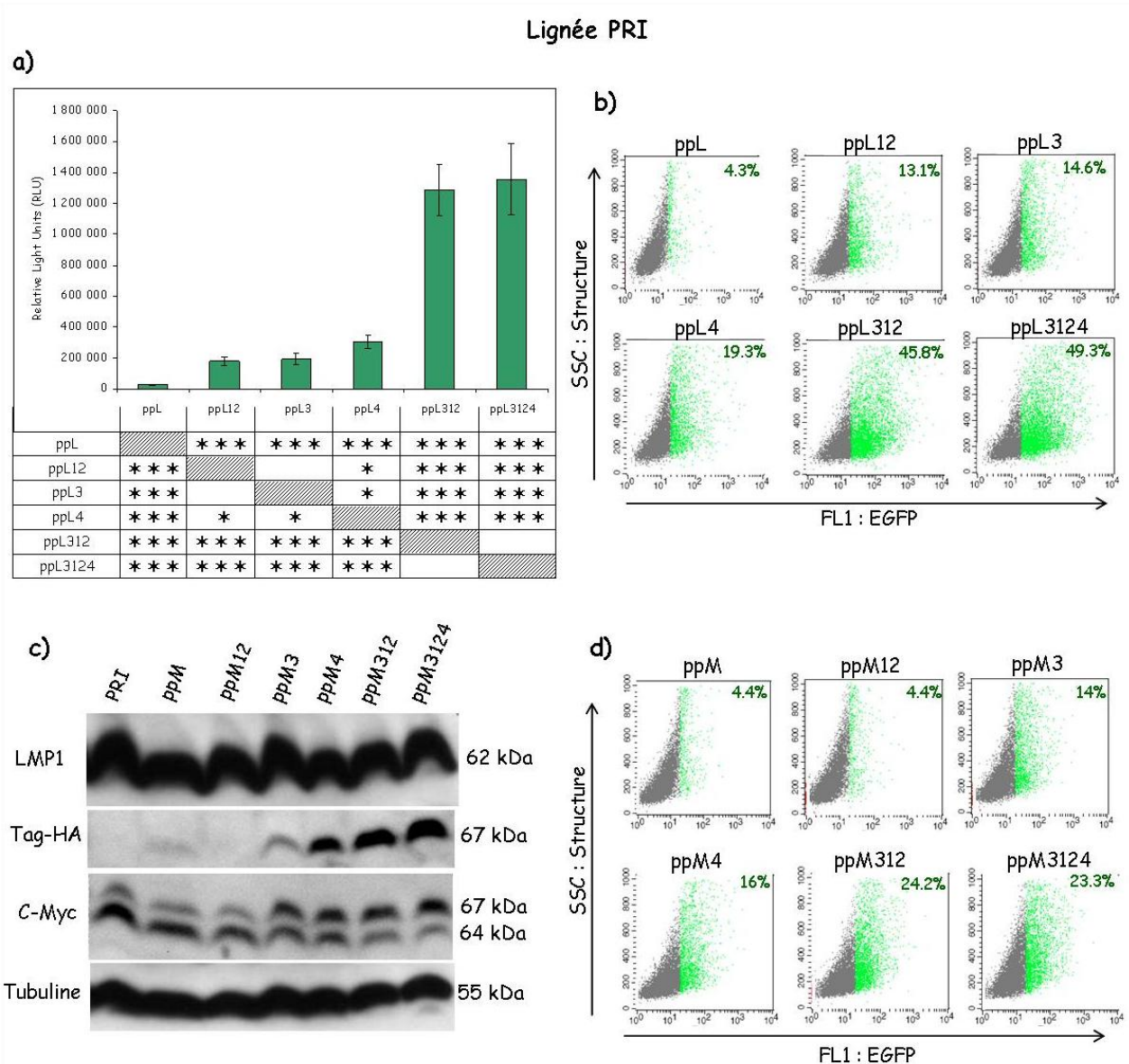


Figure 32 : Synergie entre les éléments de la LCR 3' IgH dans la lignée PRI.

a) : Lignée PRI transfectée les différents vecteurs ppL-Hhs. Analyse de l'activité transcriptionnelle des éléments Hhs. Les résultats sont exprimés en unités relatives de lumière (RLU) émises par la luciférase Firefly après ajout de son substrat. Chaque histogramme représente dix expériences indépendantes. Le tableau permet d'apprécier la significativité des différences d'activité transcriptionnelle entre les combinaisons d'Hhs (test de Student, * correspond à $p < 0.5$, ** correspond à $p < 0.01$ et *** correspond à $p < 0.001$).

b) : Lignée PRI transfectée les différents vecteurs ppL-Hhs. Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules EGFP⁺ (FL1) en fonction de la structure cellulaire (SSC). Le seuil de positivité a été établi à partir de la lignée non transfectée.

c) : Lignée PRI parentale et transfectée avec les différentes constructions ppM-Hhs. Analyse par Western-blot de l'expression des protéines c-Myc endogène, c-Myc-HA, LMP1 et de l' α -tubuline.

d) : Lignée PRI parentale et transfectée avec les différentes constructions ppM-Hhs. Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules EGFP⁺ en fonction de la structure cellulaire SSC.

3.3.2.2. Lignée EREB2-5 (LCL à latence III inducible par l'oestrogène)

La lignée EREB2-5 est cultivée de façon continue avec l'oestrogène et donc sous la dépendance du programme de prolifération associé à la latence III de l'EBV. De la même façon que pour la lignée PRI, nous avons validé les vecteurs ppL pour l'analyse de l'activité transcriptionnelle de la combinaison promoteur pV_H/éléments de la LCR 3'IgH, d'une part à l'aide du gène rapporteur *luciférase* et d'autre part par la fluorescence de l'EGFP. Les cellules transfectées par les vecteur ppM ont été analysées par Western-blot afin d'apprécier l'expression de c-Myc et par cytométrie en flux, *via* l'analyse du pourcentage de cellules EGFP positives. (cf. **Figure 33**).

Nous avons tout d'abord apprécié l'activité transcriptionnelle des éléments Hhs sur le promoteur pV_H dans la lignée EREB2-5 (cf. **Figure 33a**). L'ajout des éléments régulateurs seuls permet une augmentation significative de cette activité. L'ajout de la combinaison d'éléments permet une nette augmentation de l'activité transcriptionnelle. Cependant, comme il a été déjà remarqué pour la lignée PRI, l'effet combiné des éléments Hhs312 ne semble être que très peu modifié par l'ajout de l'élément Hhs4, puisque aucune différence significative n'est observée.

Nous remarquons également que d'une façon générale, l'activité transcriptionnelle est moins importante dans la lignée EREB2-5 que dans la lignée PRI, au regard des valeurs de RLU (maximum de 6 000 RLU pour EREB2-5 vs 1 400 000 RLU pour les PRI) (cf. **Figure 33a** vs **Figure 32a**). De fait, la corrélation avec l'émission de fluorescence par l'EGFP n'est pas observée, sans doute due à cause des différences de sensibilité entre la technique utilisant le gène rapporteur *luciférase* et la cytométrie en flux pour la détection de l'EGFP (cf. **Figure 33a et b**).

De la même façon, dans cette lignée EREB2-5, les vecteurs ppM n'autorisent pas une étude par cytométrie en flux de l'expression de l'EGFP (cf. **Figure 33d**). Dans le but de vérifier l'expression de la protéine c-Myc-HA dans les cellules EREB2-5 transfectées et sélectionnées par l'hygromycine, nous avons réalisé un Western-blot, en utilisant l'expression de LMP1 et de l' α -tubuline comme contrôle de dépôt (cf. **Figure 33c**). Cependant, nous n'avons pas détecté la présence de c-Myc-HA. Nous avons ensuite analysé l'expression de c-Myc endogène. Comme la lignée PRI, la lignée EREB2-5 exprime les deux formes de c-Myc, avec une plus forte expression de p64. Par contre, nous n'observons pas dans les cellules transfectées, une augmentation de l'expression de c-Myc p67. Notons à ce stade que nous ne disposons pas de cellules transfectées par le vecteur ppM12 (la transfection n'ayant pas aboutit à ce jour).

Ainsi, pour cette lignée, nous n'avons pas pu de mettre en évidence l'expression du transgène c-Myc-HA. Ceci est probablement dû aux différences de niveaux d'activité luciférase obtenus avec les vecteurs ppL. En effet, ils sont 100 fois moindres pour les cellules EREB2-5 que pour les cellules PRI (cf. **Figure 32a** vs **Figure 33a**).

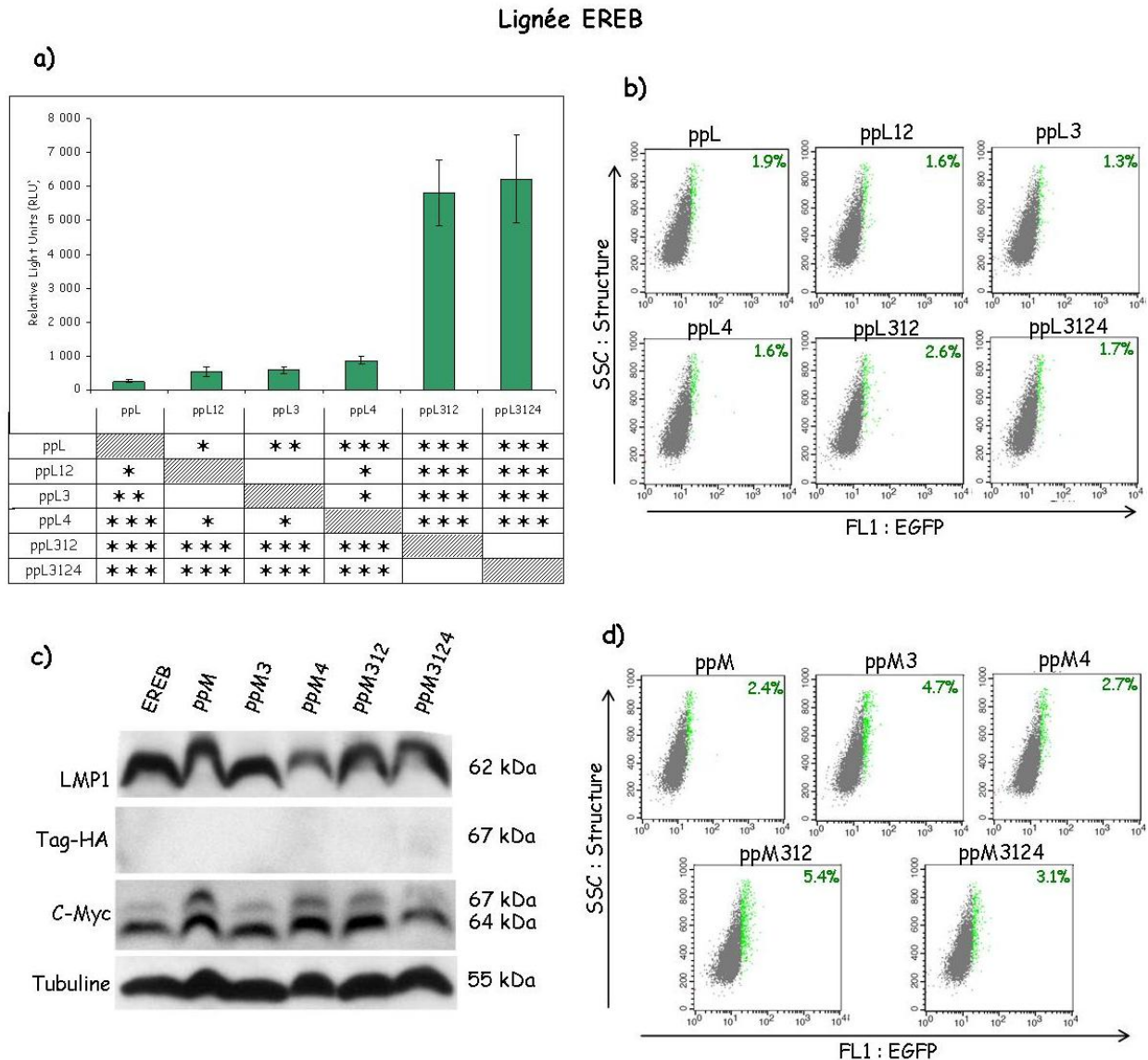


Figure 33 : Synergie entre les éléments de la LCR 3'IgH sur la lignée EREB2-5.

a) : Lignée EREB2-5 transfectée avec les différents vecteurs ppL-Hhs. Analyse de l'activité transcriptionnelle des éléments Hhs. Les résultats sont exprimés en unités relatives de lumière (RLU) émise par la luciférase Firefly après ajout de son substrat. Chaque histogramme représente six expériences indépendantes. Le tableau du dessous permet d'apprécier la significativité des différences d'activité transcriptionnelle entre les différentes combinaisons d'Hhs (test de Student, * correspond à $p < 0.5$, ** correspond à $p < 0.01$ et *** correspond à $p < 0.001$).

b) : Lignée EREB2-5 transfectée avec les différents vecteurs ppL-Hhs. Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules EGFP⁺ (FL1) en fonction de la structure cellulaire SSC. Le seuil de positivité a été établi à partir de la lignée non transfectée.

c) : Lignée EREB2-5 parentale et transfectée avec les différentes constructions ppM-Hhs. Analyse par Western-blot de l'expression des protéines c-Myc endogène, c-Myc-HA, LMP1 et de l' α -tubuline.

d) : Lignée EREB2-5 parentale et transfectée avec les différentes constructions ppM-Hhs. Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules EGFP⁺ en fonction de la structure cellulaire SSC.

Au final, nous avons obtenu la lignée cellulaire PRI transfectée stablement avec les vecteurs ppL et ppM. C'est également le cas pour la lignée EREB2-5 avec les vecteurs ppL, même si l'activité luciférase est moindre. Par contre, nous ne détectons pas l'expression du transgène c-Myc-HA dans cette lignée, et ceci malgré une sélection à l'hygromycine des cellules.

3.3.3. L'activité de la LCR 3'IgH est modulable

3.3.3.1. Tri des cellules EGFP⁺ vs EGFP⁻

Les populations de cellules transfectées de façon stable avec les vecteurs ppL s'avèrent hétérogènes en terme d'expression d'EGFP. Dans le but de pouvoir étudier plus précisément l'activité transcriptionnelle relative à l'effet des éléments régulateurs sur le promoteur pV_H, nous avons trié les cellules PRI et 1602 transfectées avec le vecteur ppL3124 (combinaison conférant une meilleure activité au promoteur pV_H). Dans un premier temps, nous avons trié les cellules en fonction de leur positivité pour l'EGFP, puis nous les avons suivies après tri afin de vérifier si ces dernières demeuraient en l'état (cf. **Figure 34**). Les populations positives triées se sont révélées hétérogènes (*i.e.* 60 et 65 % de cellules EGFP positives). Les populations négatives sont quant à elles relativement homogènes (+ de 90 % de cellules EGFP négatives).

Le suivi après tri de la fluorescence des cellules émise par l'EGFP, nous a permis de constater pour les deux lignées, une variation du pourcentage de cellules triées EGFP positives après remise en culture. Par contre, les cellules triées EGFP négatives remises en culture ont ré-exprimé le niveau basal d'EGFP avant tri (cf. **Figure 34**).

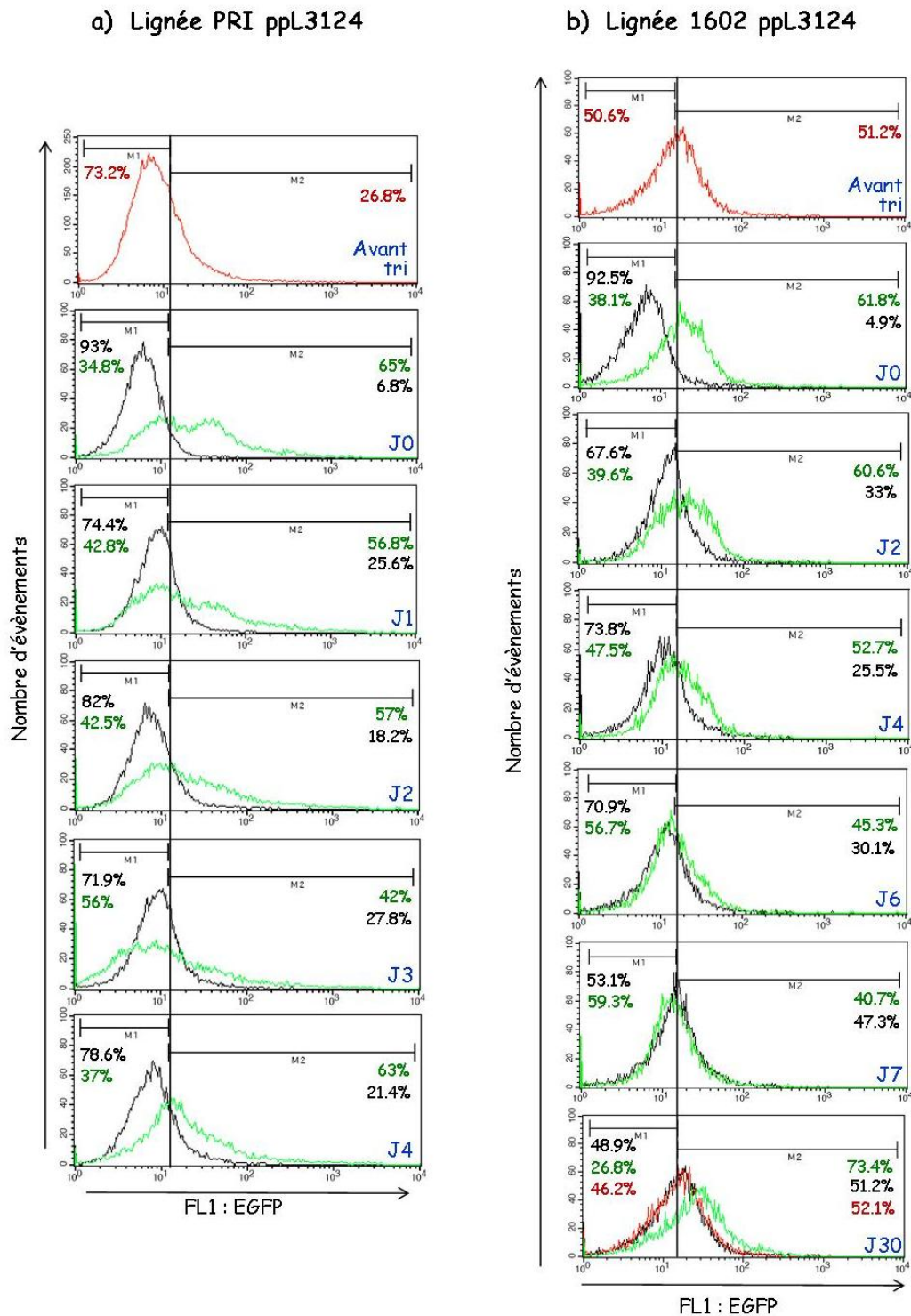


Figure 34 : Analyse par cytométrie en flux des cellules triées PRI et 1602 EGFP- vs EGFP+.

Les cellules ont été triées par cytométrie en flux afin d'obtenir deux populations distinctes exprimant (EGFP+) ou non le vecteur (EGFP-). Les cellules ont ensuite été suivies tous les jours en cytométrie afin de quantifier le pourcentage de cellules positives vs le pourcentage de cellules négatives au cours du temps. Le premier cadran de chaque colonne représente le profil des cellules non triées. Les courbes noires représentent les cellules EGFP- et les courbes vertes, les cellules EGFP+. Les barres M1 et M2 permettent de quantifier le pourcentage de cellules encadrées par cette zone. Le code couleur pour le pourcentage de cellules est le même que pour les courbes.

a) : Résultats obtenus pour la lignée PRI de J0 (jour du tri) à J4.

b) : Résultats obtenus pour la lignée 1602 de J0 (jour du tri) à J30. A J30, la courbe rouge représente le profil EGFP des cellules non triées (le même jour d'analyse que les EGFP- et EGFP+).

Nous avons voulu trier les cellules dans l'hypothèse où l'hétérogénéité d'expression de l'EGFP correspondait à un état stable de la cellule. Or, en quelques jours, nous avons remarqué un retour aux valeurs médianes d'expression de l'EGFP pour les cellules EGFP triées négatives et une variation du pourcentage de cellules EGFP positives au cours du temps. Ces résultats indiquent qu'il existe une régulation du gène rapporteur EGFP et donc une possible régulation de l'activité de la LCR 3' IgH, mais celle-ci apparaît variable dans le temps.

De ces résultats, deux hypothèses sont formulées pour expliquer cette hétérogénéité : soit la LCR 3' IgH est sensible à un facteur autocrine sécrété par la LCL, et/ou soit cette hétérogénéité est en rapport avec l'état de prolifération de la cellule.

3.3.3.2. Les lignées EREB2-5-pHEBo-pV_H-Luc

Nous avons cherché à suivre l'évolution de l'activité transcriptionnelle en fonction de l'induction du programme de prolifération, dans le modèle EREB2-5 sur 7 jours. En effet, cette lignée est inductible pour le programme de prolifération associé à la latence III du virus de l'EBV par ajout d'œstrogène dans le milieu de culture. (cf. **Figure 35**)

Dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution de l'activité transcriptionnelle sur cette lignée transfectée avec les différents vecteurs ppL, privées en œstrogène à J0. Après trois jours de privation, la prolifération des cellules transfectées est à nouveau induite par ajout d'œstrogène dans le milieu (la mesure à J3 est effectuée avant l'ajout d'œstrogène) (cf. **Figure 35a**). En accord avec nos précédentes conclusions, nous observons tout d'abord la synergie des éléments lorsqu'ils sont combinés. De plus, la réinduction d'un programme de prolifération permet une meilleure activité transcriptionnelle. En effet, elle est stable pour les cellules en quiescence (cas des EREB-ppL et EREB-ppL-Hhs seul), voire diminuée (cas des EREB-ppL-Hhs combinés), cf. J3 sur la **Figure 35a**. Au contraire, la réinduction de la prolifération permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle (J4 à J7, **Figure 35a**). Nous remarquons en outre que les cellules EREB-ppL ont modestement répondu à la réinduction de la prolifération.

Nous avons ensuite comparé plus directement l'effet de la réinduction du programme de prolifération sur la lignée EREB-ppL3124 (cf. **Figure 35b**). La lignée est lavée puis mise en culture à la même densité à J0 selon deux conditions : une condition avec œstrogène (ppL3124 Cont pour Continue) et une condition sans œstrogène (ppL3124 0). Après trois jours de culture, les cellules en condition ppL3124 0 sont divisées en deux populations, une restant en condition 0 (sans œstrogène), l'autre dans laquelle est réintroduit l'œstrogène (ppL3124 0 + E). Nous remarquons que

les cellules en prolifération continue présentent une forte activité transcriptionnelle, mais néanmoins variable au fil des jours. L'activité du gène rapporteur *luciférase* diminue dans les cellules quiescentes alors que la réinduction de la prolifération (+E) l'augmente.

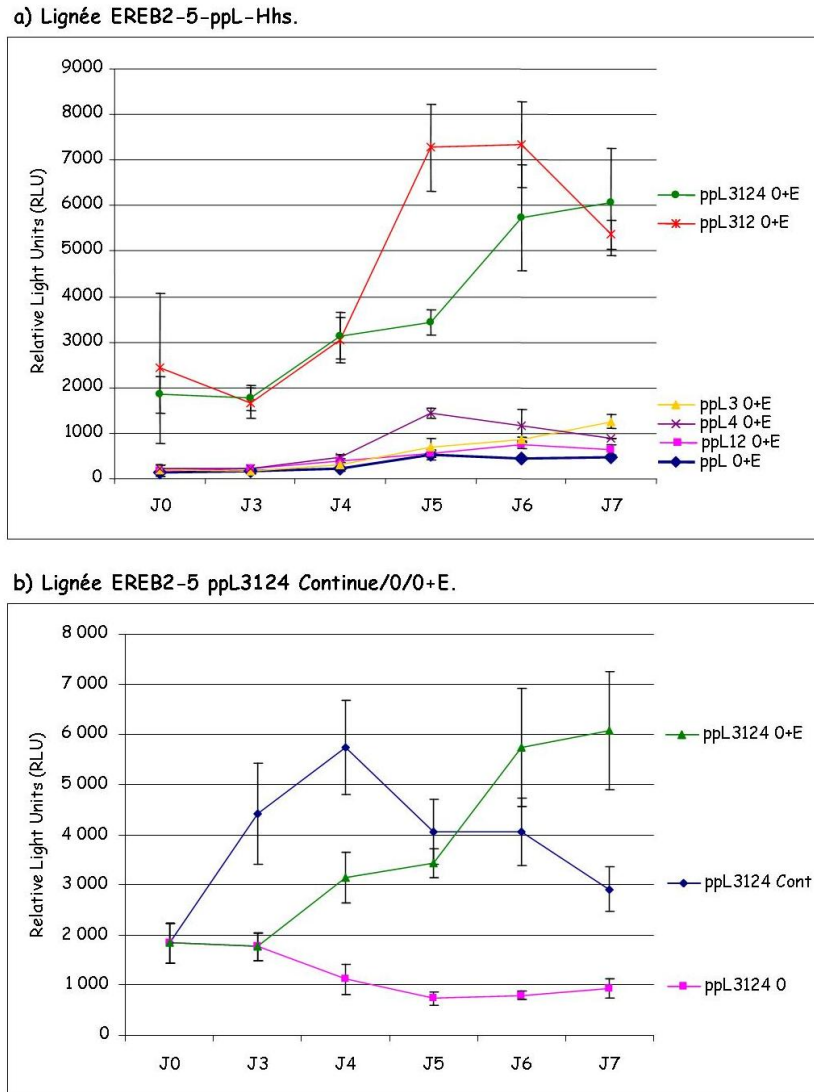


Figure 35 : Cinétique de l'activité transcriptionnelle des éléments *Hhs* dans la lignée EREB2-5 inducible.

Sur la lignée EREB2-5 transfectée avec les différents vecteurs ppL-Hhs, l'activité transcriptionnelle a été évaluée par luminescence et les résultats sont exprimés en unités relatives de lumière (RLU).

a) : Les cellules ont été privées en oestrogène à J0, puis l'oestrogène a été réintroduit dans le milieu de culture à J3. Les barres d'erreur représentent l'écart entre les moyennes de trois expériences indépendantes.

b) : La lignée EREB-ppL3124 a été cultivée en présence d'oestrogène (ppL3124 Cont), en absence d'oestrogène (ppL3124 0) ou en absence d'oestrogène pendant 3 jours puis réinduite par l'ajout d'oestrogène à J3 (ppL3124 0+E). Les barres d'erreurs représentent l'écart obtenu entre les moyennes de quatre expériences indépendantes.

Ainsi, il apparaît que le fait de passer d'un état quiescent à un état proliférant et sécréteur de facteurs cytokiniques induit l'activité de la LCR 3'IgH. La variabilité des valeurs de RLU au cours

du temps et entre les expériences pourrait s'expliquer par des variations de l'état proliférant des cellules et/ou des facteurs sécrétés.

3.3.3.3. Les inducteurs de la LCR 3'IgH

Suite à l'hypothèse d'une réponse de la LCR 3'IgH à des facteurs cytokiniques, nous avons voulu tester l'effet d'inducteurs de la cellule B. Nous avons étudié l'effet de l'ajout de CD40-L, et de différentes cytokines sécrétées par les LCLs : Il-2, Il-4, Il-6, Il-10, Il-12, IFN- γ et TNF- α , sur les lignées PRI et les EREB2-5 transfectées avec les différents vecteurs. Les cellules ont été mises en présence des différents facteurs après lavage et remises en culture à la même densité. Nous présentons les résultats obtenus avec le CD40-L sur les lignées PRI et EREB2-5 transfectées avec le vecteur ppL3124, et ne constatons aucun effet significatif sur l'activité transcriptionnelle (cf. **Figure 36**). Il en a été de même avec les différentes cytokines citées précédemment.

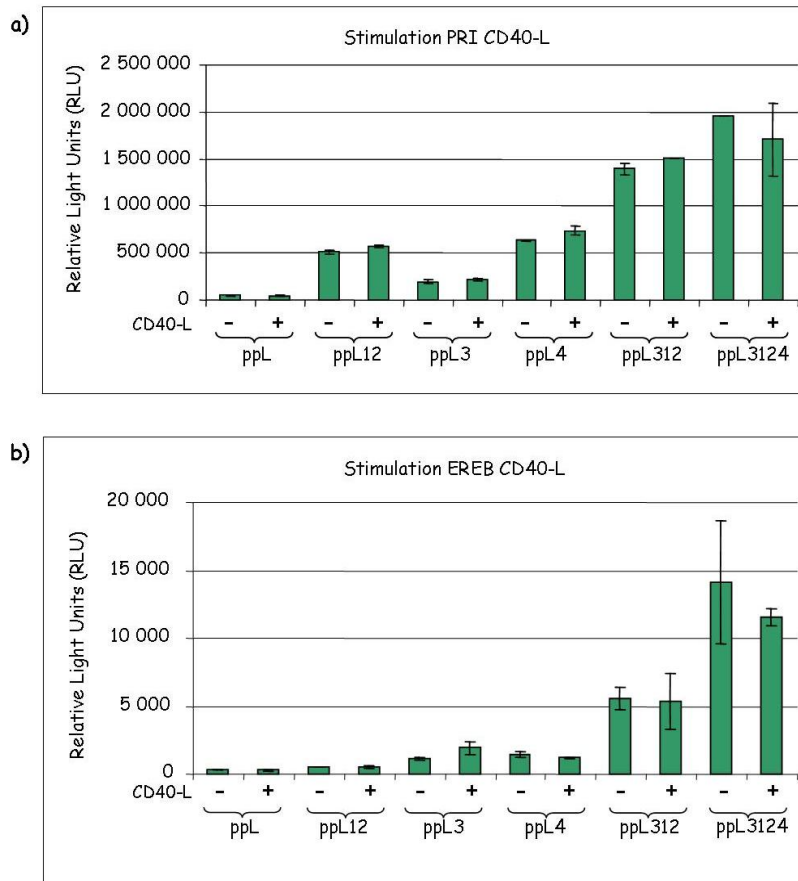


Figure 36 : Lignées PRI et EREB2-5 ppL-Hhs stimulées par le CD40-L.

Les cellules sont mises en présence de fibroblastes exprimant le ligand du CD40 pendant 24h. En parallèle, chaque lignée est mise en culture avec des fibroblastes non transfectés. L'activité transcriptionnelle est évaluée par luminescence et les résultats sont exprimés en unité relative de lumière (RLU). L'expérience a été réalisée en duplicate.

a) : Stimulation des cellules PRI-ppL-Hhs.

b) : Stimulation des cellules EREB-ppL-Hhs.

Nos premières conclusions nous amènent à penser que dans le cas des lignées testées PRI et EREB2-5, l'activité transcriptionnelle des éléments de la LCR 3'IgH sur le gène rapporteur *luciférase* n'est pas nulle et atteint un seuil qu'il est difficile d'augmenter. Nous pouvons alors supposer que c'est le virus EBV qui conduit à l'activation indirecte des éléments *via* la sécrétion autocrine de facteurs dans le milieu de culture.

3.3.4. L'oncogène *c-myc* sous le contrôle de la LCR 3'IgH

Dans le cadre de cette étude, nous cherchons d'une part à évaluer l'activité transcriptionnelle des éléments de la LCR 3'IgH, et d'autre part, à tester le pouvoir d'oncogènes mis sous la dépendance de ces éléments, dans le lignage B. Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier l'oncogène *c-myc*, qui se trouve, du fait d'une translocation, placé à proximité des éléments régulateurs 3'IgH dans les cas de BL. Récemment, dans le laboratoire, il a été montré, *in vivo*, que ces éléments seuls suffisaient à activer la transcription du gène *c-myc* placé sous leur contrôle (Truffinet et al., 2007).

Nous avons utilisé la lignée EREB2-5, LCL dépendante de l'œstrogène pour sa prolifération. Nous avons privé en œstrogène les cellules EREB-ppM3124 et avons suivi leur évolution au cours du temps, en déterminant l'expression de c-Myc par Western-blot et le profil d'expression de l'EGFP par cytométrie en flux (cf. **Figure 37**). Il ne nous a pas encore été possible de suivre leur prolifération avec précision cependant, d'une façon générale, les cellules ne prolifèrent pas ou peu durant les 15 premiers jours suivant la privation en œstrogène.

Comme remarqué précédemment sur la lignée EREB2-5 transfectée avec les vecteurs ppM, nous n'observons pas l'expression de la protéine c-Myc-HA issue du vecteur. Par contre, la protéine c-Myc endogène est exprimée (EREB2-5 parentales et EREB-ppM3124, cf. **Figure 37a**). Suite à la privation en œstrogène, nous constatons une diminution de l'expression des deux formes de c-Myc endogène. Cette observation corrèle avec leur entrée en quiescence due à la privation en œstrogène. Cependant, nous avons pu remarquer à J30 (et J34), une forte ré-expression de la protéine c-Myc endogène associée à une reprise de la prolifération en l'absence d'œstrogène. Nous ne sommes pas en mesure de présenter une courbe de prolifération, mais plusieurs indicateurs semblent étayer l'hypothèse de l'entrée en cycle des cellules induite par le vecteur ppM3124. En effet, les cultures n'ont pas été supplémentées de milieu neuf pendant les 15 premiers jours et nous avons observé une reprise spontanée de la culture à J20 ; l'expression endogène de c-Myc est à nouveau observée (J30)

et l'expression de la protéine LMP1 diminue suite à la privation en œstrogène jusqu'à son extinction (J30 et J34).

Ainsi, même s'il ne nous est pas possible de mettre en évidence l'expression de c-Myc-HA, il se trouve que la présence du vecteur a permis de "transformer" cette lignée. En effet, les cellules sont continûment cultivées en présence d'hygromycine (sélection du vecteur) et sans œstrogène.

Nous avons également privé en oestrogène la lignée EREB-ppM, ne contenant pas d'éléments régulateurs Hhs (cf. **Figure 37b**). Les résultats obtenus en terme de prolifération et d'expression de c-Myc sont les mêmes, à une différence près : à J20, alors que les cellules prolifèrent, les cellules ré-expriment c-Myc mais ré-expriment également LMP1.

Enfin, nous avons suivi en parallèle la fluorescence émise par l'EGFP des cellules EREB-ppM3124-0 et EREB-ppM-0 (privées en œstrogène) (cf. **Figure 37c**). Là encore, comme précédemment, les cellules transfectées n'expriment quasiment pas l'EGFP. Cependant, au cours de la privation, nous avons constaté une augmentation de la fluorescence EGFP : 12% de cellules positives à J5, 40% à J14 et plus de 60% à J18. De façon surprenante au-delà de 20 jours de privation, les cellules ré-expriment c-Myc endogène et perdent l'expression de l'EGFP. Les résultats sont similaires pour la lignée EREB-ppM (85% de cellules exprimant l'EGFP à J12 et seulement 6% à J20). Alors que jusqu'à présent il ne nous était pas possible de mettre en évidence l'expression du vecteur, ces résultats démontrent sa présence. Cependant, il ne semble s'exprimer que dans le cas où les cellules sont quiescentes (J5 à J18).

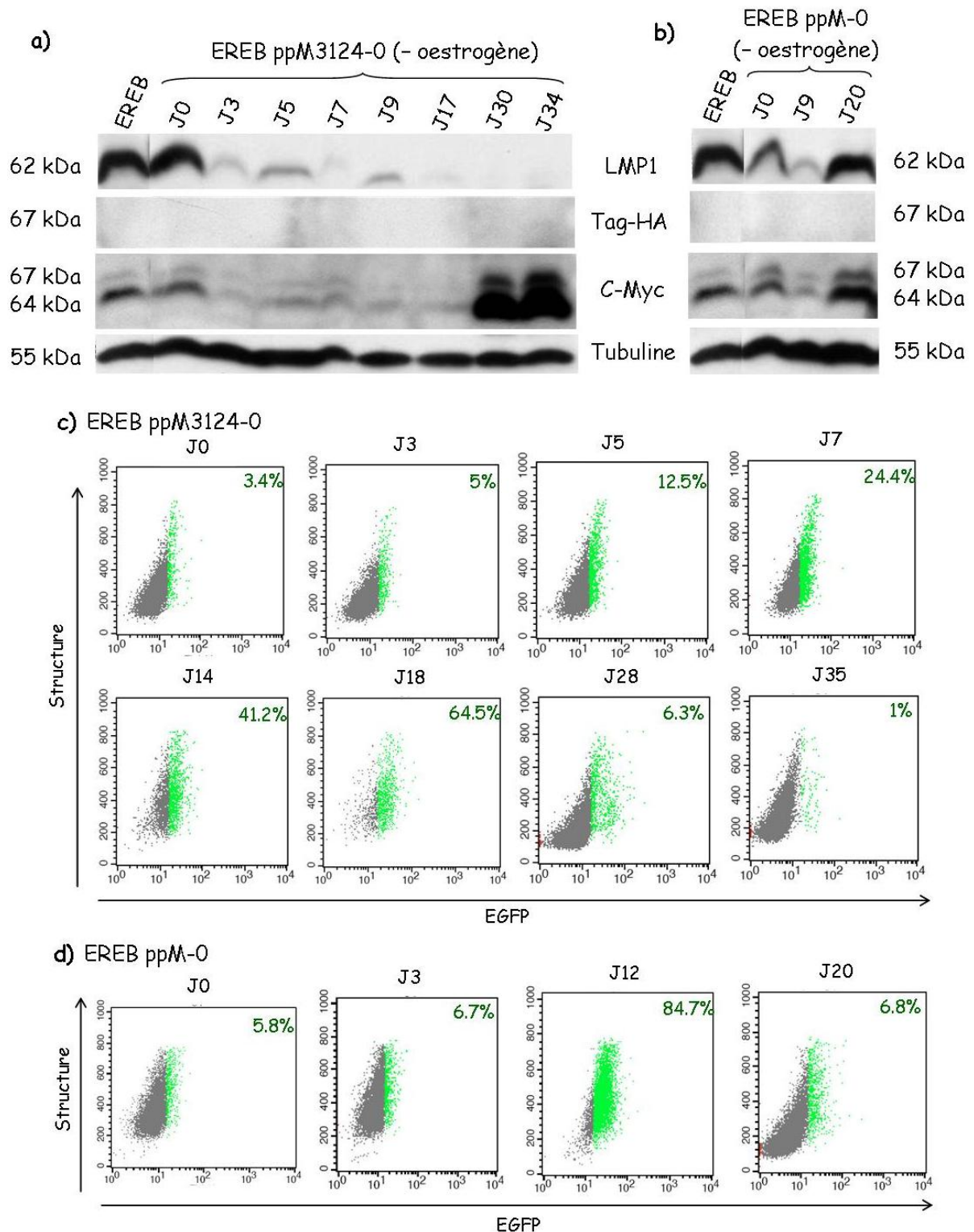


Figure 37 : Suivi des cellules EREB-ppM3124 et EREB-ppM privées en œstrogène.

Les lignées EREB-ppM3124 et EREB-ppM ont été privées en œstrogène à J0.

a) et b) : Profils d'expression des protéines c-Myc, c-Myc-HA, LMP1 et de l' α -tubuline sur la lignée EREB-ppM3124 (**a**) privées en œstrogène de J0 à J34 et sur la lignée EREB-ppM (**b**) privée en œstrogène de J0 à J20. La première colonne représente le profil d'expression de ces mêmes protéines pour la lignée EREB2-5 parentale.

c) et d) : Suivi par cytométrie en flux du pourcentage de cellules exprimant l'EGFP au cours de la privation en œstrogène de la lignée EREB-ppM3124 (**c**) et de la lignée EREB-ppM (**d**).

Au final, cette expérience démontre qu'il nous a été possible de "transformer" la LCL EREB2-5 avec les vecteurs ppM, puisqu'après 20 jours de privation en œstrogène, les cellules ré-entrent dans un programme de prolifération. Le profil d'expression de LMP1 diffère entre les deux vecteurs testés, suggérant que les mécanismes impliqués avec le vecteur contrôle ppM et avec le vecteur ppM3124 sont différents. De plus, alors que le vecteur n'était jusqu'à présent que peu ou pas détectable dans les cellules EREB2-5 transfectées en cytométrie en flux, les cellules EREB-ppM et EREB-ppM3124, quiescentes, expriment l'EGFP, indépendamment de la présence d'éléments activateurs. Cependant, dans les deux cas, la transformation des cellules est en rapport avec l'expression de la forme endogène p64 de c-Myc et non du transgène c-Myc-HA de 67 kDa.

3.4. Discussion

Ce travail avait pour but d'établir un nouvel outil moléculaire dédié à la transformation du lymphocyte B. Pour ce faire nous avons créé une nouvelle famille de vecteurs nommés pHEBo-pV_H-Luc/Myc-Hhs (cf. **Figure 30**), à partir du vecteur pRTS1 (Bornkamm et al., 2005), lui-même dérivé du squelette pHEBo (Yates et al., 1985). Ces nouveaux outils sont composés d'un promoteur pV_H bidirectionnel et des éléments de la LCR 3'IgH humaine, décrits comme capables de déréguler l'oncogène *c-myc* dans les cas de BL. Nous avons choisi d'étudier les éléments régulateurs de la LCR 3'IgH de façon isolée ou combinée, comme c'est le cas physiologiquement. Ces éléments ont été décrits la même année par 3 équipes dont celle de Michel Cogné (Chen and Birshstein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Nous avons travaillé sur les éléments isolés à partir de fragments génomiques par Eric Pinaud. Nous avons cloné dans les vecteurs "ppL" et "ppM" les éléments isolés : Hhs1-2, Hhs3 et Hhs4 ainsi que leur combinaison, dans leur configuration endogène (cf. **Tableau 5**).

Nous observons que lorsqu'ils sont pris isolément, les éléments humains activent la transcription initiée au promoteur pV_H, dans les lignées cellulaires B EBV+ PRI et EREB2-5, c'est-à-dire à un stade B mature (cf. **Figure 32** et **Figure 33**). Ces résultats corrént avec les expériences précédentes utilisant des gènes rapporteurs (*luciférase* ou *CAT*) sous le contrôle de promoteurs des loci d'Ig (V_K ou V_H) dans différentes lignées, dont des lignées B matures (Raji, Daudi, HS-Sultan) (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997). Nous montrons que les éléments Hhs1-2 et Hhs3 présentent une activité équivalente dans ces deux lignées, alors que Hhs4 apparaît être un meilleur activateur. Ces résultats sont légèrement différents de ceux issus des études précédentes qui montrent que Hhs1-2 est le plus fort des éléments, précisant néanmoins que cette forte activité apparaît restreinte aux cellules B matures, alors que Hhs4 est actif tout au long du développement B. Contrairement à

la souris, l'homme possède deux "blocs" d'éléments régulateurs en aval de chacun des gènes $C\alpha$. L'équipe de Birshstein a noté une meilleure activité transcriptionnelle des éléments situés en $C\alpha 2$, comparé à ceux de $C\alpha 1$ (Chen and Birshstein, 1997). De plus, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'élément Hhs1-2 est très polymorphe et contient un nombre de séquences répétées variables (de 1 à 4) et que sa capacité à activer la transcription est étroitement liée au nombre de ces séquences (Denizot et al., 2001). Nous avons utilisé l'élément Hhs1-2 $\alpha 1$, contenant une seule séquence répétée, autrement dit, le plus faible des éléments Hhs1-2. Ceci explique sans doute l'absence de différences significatives entre l'élément Hhs1-2 $\alpha 1$ et l'élément Hhs3 $\alpha 2$. Enfin, dans nos modèles, nous montrons que Hhs4 paraît être un meilleur activateur que Hhs1-2 et Hhs3.

Nous montrons également que la combinaison des éléments régulateurs permet une très forte activité transcriptionnelle lorsqu'elle est comparée à celle des éléments isolés. Cette synergie a largement été constatée chez la souris (Madisen and Groudine, 1994; Chauveau et al., 1998). Les quelques études menées sur les combinaisons d'activateurs humains montrent le même type de synergies comme par exemple, la forte activité transcriptionnelle induite par la combinaison Hh3/Hhs1-2 (Pinaud et al., 1997). Une étude détaillant l'activité des facteurs lorsqu'ils sont combinés montre que l'ajout de Hhs4 permet une nette augmentation de l'activité transcriptionnelle en comparaison de celle obtenue avec Hhs3/Hhs1-2 (Hu et al., 2000). Cependant, dans cette étude, effectuée sur des cellules B matures (HS-Sultan et DG75), les éléments contrôlent les promoteurs I α et I γ . Dans nos travaux, nous observons que l'ajout de Hhs4 à la combinaison Hhs3/Hhs1-2 ne permet pas une meilleure activité transcriptionnelle du promoteur pV_H.

Les résultats obtenus sur les cellules EREB-ppL-Hhs mettent en avant également la sensibilité de la technique utilisant le gène rapporteur de la *luciférase*, qui nous a permis de vérifier que les EREB2-5 sont transfectées avec les vecteurs ppL, alors que nous ne détectons pas l'expression de l'EGFP. En outre, notons que pour la lignée PRI, la bidirectionnalité du promoteur pV_H441 décrite par (Doyen et al., 1989) est clairement fonctionnelle.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons donc conclure que ces nouveaux vecteurs sont fonctionnels dans les LCLs étudiées.

Nous observons que l'activité des éléments de LCR 3'IgH est modulable et variable. En effet, en cherchant à trier les cellules exprimant le plus fortement le transgène, le suivi de leur fluorescence après tri nous a montré une hétérogénéité d'expression. Ces résultats suggèrent que

l'expression du transgène est instable ou corrélée à un état instable de la cellule (cf. **Figure 34**). Ainsi, nous avons émis deux hypothèses : soit cet état cellulaire variable est dû à une réponse des éléments de la LCR 3'IgH au cours du temps (cycle cellulaire par exemple), soit il est dû à des facteurs présents intrinsèquement dans la culture. Nous montrons que la transition d'un état quiescent à un état proliférant induit l'activité transcriptionnelle des éléments de la LCR 3'IgH. (cf. **Figure 35**). En rapport avec la deuxième hypothèse, nous avons cherché à induire l'activité transcriptionnelle des éléments de la LCR 3'IgH, notamment par l'utilisation d'un puissant activateur de la cellule B : l'engagement de la signalisation CD40 (cf. **Figure 36**). Cependant, aucun effet significatif n'a été mis en évidence, que ce soit avec l'engagement de la voie CD40 ou d'autres inducteurs (notamment des cytokines, puisque la LCR 3'IgH est impliquée dans le mécanisme de CSR). Ainsi, nous pensons que dans le cas de nos cultures, les facteurs présents pourraient suffire à induire une activité de la LCR 3'IgH qu'il est difficile d'augmenter par ajout exogène. En effet, il est connu que les protéines de l'EBV détournent les voies de signalisation cellulaire à son profit et induisent la sécrétion par la LCL de nombreuses cytokines, dont celles testées. Des expériences préliminaires ont été réalisées sur des EREB2-5 privées en œstrogène afin d'apprécier une éventuelle réponse aux inducteurs cités précédemment. Cependant, il n'est pas possible de conclure à ce jour, mais peu d'effets semblent être observés (résultats non présentés). Nous n'avons donc pas été en mesure de mettre en évidence l'existence de facteurs influençant l'activité transcriptionnelle de la LCR 3'IgH.

Une des clefs de l'activité transcriptionnelle des éléments de la LCR 3'IgH est la disponibilité des facteurs de transcription. Nous venons de conclure que l'activité des éléments est variable et modulable, mais sans avoir mis en évidence de facteurs impliqués, exceptée l'induction de la prolifération. De plus, nous observons que l'activité transcriptionnelle obtenue dans la lignée PRI s'avère nettement supérieure à celle obtenue dans la lignée EREB2-5 (cf. **Figure 32** vs **Figure 33**). Il est possible que les facteurs transcriptionnels présents dans ces lignées ne soient pas les mêmes ou qu'ils soient activés différemment. Il serait donc intéressant d'étudier de façon plus précise les facteurs transcriptionnels capables de se fixer et d'induire ou de réprimer l'activité des différents éléments.

A ce jour, nous savons que le facteur NF- κ B se fixe sur l'élément Hhs4 et est impliqué dans le changement d'utilisation des promoteurs de *c-myc*, observé dans les BL (Kanda et al., 2000). De plus, le facteur YY1 qui se fixe sur Hhs3 joue également un rôle dans ce mécanisme, de par le

recrutement du facteur CBP permettant une augmentation de l'acétylation des histones au niveau du promoteur de *c-myc* (Hu et al., 2007). Au sein de Hhs4, deux sites Sp1 ont été mis en évidence et une équipe a montré que ces facteurs dérégulent le promoteur du gène *bcl-2* lorsque celui-ci est transloqué, comme c'est le cas dans les lymphomes folliculaires (Heckman et al., 2003). Enfin, des auteurs ont montré que les facteurs Oct-1, Oct-2 et NF- κ B coopèrent dans l'activité de l'élément Hhs4, dans la lignée cellulaire de BL (BL2). Ils précisent que les sous-unités du facteur NF- κ B se fixant à Hhs4 sont les sous-unités p50 et RelB (Sepulveda et al., 2004). Afin d'envisager quels facteurs transcriptionnels, en plus de ceux proposés par la littérature, peuvent se fixer sur les éléments de la LCR 3'IgH, nous avons soumis les séquences des éléments à la base de données Génomatix–MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) (Cartharius et al., 2005). Cet outil permet de retrouver à partir d'une séquence, des motifs consensus supposés, pouvant fixer des facteurs transcriptionnels. Pour Hhs1-2, le nombre de sites potentiels trouvés est de 27. Il est intéressant de remarquer que deux sites de fixation pour la sous-unité p50 du facteur NF- κ B et un site pour les facteurs STAT3, Oct-1, BSAP/PAX5 et RBP-J κ sont proposés. L'un des sites NF- κ B et le site Oct correspondent aux sites décrits par l'équipe de Michel Cogné (Pinaud et al., 1997) d'après les homologies des séquences murine et humaine. Concernant Hhs3, 14 sites sont proposés, dont un site pour GATA1, Ets, STAT5, AP-4 et un site pour c-Rel. Enfin, pour Hhs4, 7 sites sont proposés, dont un site de fixation pour Pax5, pour c-Rel, Oct-1 et Ap-4. Ces observations nous confirment la présence de certains sites mais nous indiquent que certains facteurs, comme PAX5 pourraient également avoir un rôle à jouer. Il sera donc nécessaire de confirmer la présence de ces facteurs notamment par des expériences de "footprinting". Dorénavant, ces analyses peuvent être réalisées avec un appareil de séquençage, méthode permettant de s'affranchir de l'utilisation d'éléments radioactifs habituellement utilisés, afin d'observer précisément une région protégée par la fixation d'un facteur (Yindeeoungyeon and Schell, 2000).

La mise en évidence de facteurs se fixant directement sur les éléments de LCR 3'IgH pourrait permettre de comprendre par quels mécanismes et à la suite de quels stimuli s'exerce son activité transcriptionnelle. A ce titre, l'étude du facteur NF- κ B, dont la fixation a été démontrée sur Hhs4, mais pas sur les autres éléments présentant des sites potentiels, apparaît intéressante dans notre modèle de LCLs. En effet, ce facteur est activé constitutivement dans ces lignées *via* la protéine LMP1 de l'EBV. Nous avons observé que l'élément Hhs4 isolé augmente significativement l'activité transcriptionnelle du promoteur pV_H, alors que son ajout à la combinaison de Hhs3/Hhs1-2 n'a que peu d'effet. Ces observations nous laissent supposer un rôle de NF- κ B sur l'activité des

éléments Hhs1-2 et Hhs3. Ainsi, l'étude des sous-unités NF- κ B se fixant sur les différents éléments et leurs coopérations éventuelles avec d'autres facteurs peut être envisagée.

La construction de ce nouvel outil moléculaire a pour vocation à la fois d'étudier l'activité transcriptionnelle de régions régulatrices, mais également d'apprécier le pouvoir transformant d'oncogènes. Nous avons choisi d'étudier le pouvoir transformant de *c-myc* lorsqu'il est sous la dépendance des éléments de la LCR 3'IgH. Après avoir transfecté nos nouveaux vecteurs ppM dans les lignées PRI et EREB2-5, nous n'avons pas été en mesure de détecter ni l'expression de c-Myc-HA, ni celle de l'EGFP dans la lignée EREB2-5. Cependant, nous avons sélectionné les lignées EREB-ppM et EREB-ppM3124 privées en oestrogène sous hygromycine. En effet, nous savons que la privation en œstrogène de la lignée parentale EREB2-5 aboutit au bout de 3 jours à la quiescence des cellules, corrélée à une diminution de l'expression de LMP1 et de c-Myc. Nous montrons en **Figure 37** qu'au bout de 30 jours de privation en oestrogène, les cellules EREB-ppM3124 ré-expriment la protéine c-Myc endogène, expression plus importante qu'avant leur privation, mais ne ré-expriment pas LMP1. En parallèle, après 20 jours de privation les cellules EREB-ppM (donc sans élément régulateur) ré-expriment c-Myc endogène, mais ré-expriment également LMP1. Nous sommes donc face à deux phénomènes différents. Ainsi, à ce niveau, trois questions se posent.

La première question évidente est celle de la présence des vecteurs ppM dans la lignée EREB2-5 transfectée. Nous pouvons supposer que les vecteurs sont présents et fonctionnels du fait de la sélection par l'hygromycine combinée à l'absence de stimuli de proliférations (privation d'œstrogène). En effet, nous avons vérifié que l'ajout d'hygromycine dans la culture de la lignée parentale EREB2-5 ne permet pas la survie cellulaire (résultats non présentés). Une autre observation suggérant la présence du vecteur, du moins transitoire, est l'expression de l'EGFP par les cellules en cours de privation (cf. **Figure 37c et d**). Cependant, il apparaît primordial à ce niveau de vérifier la présence du vecteur par la réalisation d'une expérience de PCR dans les cultures continues d'une part, et de vérifier si le vecteur est toujours présent après 30 jours de privation d'autre part. Il sera également important de quantifier le nombre de copies par cellules dans chaque lignée transfectée stablement avec chacun des vecteurs, en utilisant la technique de PCR quantitative.

La deuxième question fait référence à l'expression transitoire de l'EGFP observée lors de la privation des cellules en œstrogène (cf. **Figure 37c et d**). En effet, alors que nous observons l'expression de l'EGFP suite à cette privation, nous ne détectons pas la protéine c-Myc-HA. Ceci

est peut-être le fait d'une meilleure sensibilité de la technique de cytométrie en flux par rapport au Western-blot, ou peut-être le fait du promoteur pV_H. En effet, ce promoteur conduit la transcription de façon bidirectionnelle, mais il a été montré que l'équilibre entre les deux sens de transcription peut être affecté par des mutations dans les motifs UPE (Doyen et al., 1989). Suite à nos observations, nous émettons l'hypothèse que le promoteur pourrait conduire préférentiellement la transcription "antisens" (*i.e.* du gène EGFP) alors que les cellules sont quiescentes et "sens" (*i.e.* des gènes *luc* ou *c-Myc-HA*) lorsque celles-ci sont en cours de prolifération. De plus, cet effet serait indépendant des éléments de la LCR 3'IgH puisque l'augmentation de l'expression de l'EGFP dans les cellules quiescentes est retrouvée aussi bien au niveau de la lignée EREB-ppM3124-0 que de la lignée EREB-ppM-0. La littérature récente montre l'existence de transcrits "antisens" au locus IgH *in vivo*, notamment au sein des régions V_H avant réarrangement, donc possiblement initiés aux promoteurs pV_H (Bolland et al., 2004; Perlot and Alt, 2008).

Enfin, la troisième interrogation concerne la mécanistique qui aboutit à la transformation des cellules. En effet, comment les lignées EREB-ppM et EREB-ppM3124 sont-elles devenues proliférantes après 20 jours de privation en œstrogène ? Est-ce que d'autres facteurs présents dans la cellule (autres que les vecteurs) ont permis ce retour à un état proliférant ? Il faudra donc vérifier que des EREB2-5 parentales privées en œstrogène ne prolifèrent pas spontanément suite à 20 jours de privation, témoignant de mutations ayant permis à la lignée de dériver indépendamment de la présence de nos nouveaux vecteurs. Il faudra également appréhender le rôle du vecteur lui-même en privant en œstrogène les cellules EREB transfectées avec le vecteur "pp", ne contenant ni ADNc, ni éléments régulateurs. Concernant la lignée EREB-ppM ; nous observons qu'après 20 jours de privation en œstrogène, elle ré-exprime à la fois *c-Myc* endogène et LMP1. Il est important de vérifier si cette lignée est en latence II ou III. Parallèlement, la lignée EREB-ppM3124 ne ré-exprime pas la protéine LMP1 mais ré-exprime *c-Myc* endogène et ce, de manière beaucoup plus importante que dans la lignée EREB2-5 parentale ou que dans les cellules transfectées maintenues en culture continue avec œstrogène. Ces résultats nous conduisent à évoquer une possible instabilité génétique affectant directement le gène *c-myc* endogène. Est-il possible que le gène *c-myc* ait subi des mutations, particulièrement au niveau de ses promoteurs ou de ses éléments régulateurs négatifs, aboutissant à la surexpression de la protéine endogène ? D'autres causes de la dérégulation de l'expression de *c-myc* sont son amplification ou sa translocation. Il sera donc nécessaire d'étudier le gène *c-myc* endogène sur cette nouvelle lignée EREB-ppM3124, en premier lieu par séquençage, afin d'identifier d'éventuelles mutations. Puis, il sera utile de comparer le profil d'expression des gènes entre les lignées EREB-ppM et EREB-ppM3124, gènes impliqués dans

l'acquisition des hypermutations somatiques, dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou encore des gènes codant des facteurs ciblant *c-myc*. Dans ce contexte, la question du rôle des vecteurs ppM (et donc de l'expression à très bas niveau du transgène *c-Myc-HA*) dans la genèse de la dérégulation de *c-myc* endogène devra être étudiée.

Les questions qui se posent en particulier sur la mécanistique ayant aboutit à la transformation des cellules sont aujourd'hui totalement ouvertes. Le vecteur est-il encore présent dans les cellules proliférantes en l'absence d'oestrogène ? Si oui, quel est son rôle ? Est-ce que les éléments de la LCR 3'IgH portés par le vecteur ppM3124 ont causé la dérégulation de l'expression de *c-myc* endogène, dérégulation observée avec le vecteur ppM, mais dans une moindre mesure ? Quel est le rôle du transgène *c-Myc-HA* ?

Une fois ces problématiques résolues et si cet outil a permis effectivement la transformation de la lignée EREB2-5, trois perspectives à plus long terme se profilent.

Tout d'abord, il conviendrait de transfecter les EREB2-5 avec les différents variants ppM-Hhs élaborés afin d'étudier le rôle de chacun des éléments isolés ou combinés. Cette expérience pourrait nous renseigner sur les facteurs transcriptionnels impliqués en fonction du pouvoir transformant du vecteur utilisé et donc de (ou des) l'élément(s) mis en cause.

Une deuxième perspective est de mettre au point la transfection de cellules B primaires avec ces vecteurs ppM. En effet, jusqu'à présent, le seul moyen d'immortaliser des cellules B primaires est l'infection par l'EBV. Nous avons réalisé quelques essais préliminaires de transfection avec la méthode Amaxa[®]. Ces essais n'ont pour l'instant pas aboutit avec nos vecteurs, dont les tailles sont particulièrement importantes (> 10 Kb), mais des mises au point supplémentaires sont nécessaires, puisque cette technique nous a permis de réussir la transfection d'un plasmide contrôle (exprimant l'EGFP). Le succès de la transfection de ces cellules avec nos vecteurs ppM nous permettrait d'étudier les mécanismes moléculaires de la transformation du lymphocyte B.

Enfin une dernière perspective, directement en rapport avec l'originalité de ces nouveaux vecteurs, est de remplacer l'oncogène d'étude et/ou la région régulatrice. En effet, le plasmide étant organisé en cassette, il est aisé de retirer l'ADNc de *c-Myc* et de le remplacer par un ADNc d'un autre oncogène : *Bcl-2* ou *cycline D1*, anti-oncogènes connus pour être dérégulés par les éléments de la LCR 3'IgH. En outre, d'autres oncogènes associés à d'autres régions régulatrices pourraient être testés afin de comprendre les mécanismes de la lymphomagenèse de la cellule B.

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE,
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. DISCUSSION GENERALE

Les travaux réalisés lors ma thèse ont permis de répondre à certaines questions et de confirmer des observations issues de la littérature mais néanmoins sous un jour nouveau dans les modèles utilisés. L'ensemble de cette étude pose également de nouvelles questions, en particulier sur les rôles réciproques de c-Myc et NF- κ B, dans le contexte de l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV).

1.1. Quels sont les mécanismes de "transformation" des EREB ppM3124 ?

Comme nous l'avons vu en détail dans l'introduction, le facteur de transcription c-Myc est un régulateur clef de nombreuses activités biologiques et sa dérégulation contribue à la tumorigenèse. Nous avons mis au point un nouvel outil moléculaire devant en principe nous permettre d'étudier le pouvoir transformant de c-Myc lorsqu'il est placé sous la dépendance des éléments régulateurs situés en 3' du locus des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines, comme c'est le cas dans les BL. Nos résultats suggèrent que la transfection d'un vecteur dont l'expression de c-Myc est contrôlée par le promoteur pV_H, lui-même sous la dépendance des éléments régulateurs de la LCR 3'IgH dans les cellules EREB2-5, pourrait permettre de transformer cette lignée, en la rendant indépendante de l'ajout d'oestrogène. Au terme de cette "transformation", nous observons une surexpression de c-Myc endogène, alors que l'expression de c-Myc issu du transgène est indétectable. De plus, le même effet de "transformation" est obtenu avec le vecteur ppM (sans les éléments régulateurs de la LCR 3'IgH), mais dans ce cas, les cellules ré-expriment c-Myc endogène et la protéine LMP1 de l'EBV. Ces deux modèles sont en accord avec le fait bien connu que c-Myc est associé à la prolifération et à l'immortalisation des cellules.

Quel rôle le vecteur ppM3124, comprenant les éléments régulateurs de la LCR 3'IgH, a-t'il joué dans la dérégulation du gène *c-myc* endogène et dans l'indépendance à l'oestrogène de la lignée EREB-ppM3124 ? Deux phénomènes peuvent être considérés : la dérégulation de l'expression de c-Myc endogène et la perte d'apoptose.

A la suite d'une étude menée au sein de notre laboratoire, nous savons que la région LCR 3'IgH seule suffit à déréguler *c-myc* (Truffinet et al., 2007). Il nous paraît improbable que le locus

c-myc ait pu être transloqué au locus IgH durant cette phase de transformation. La mise en évidence récente des interactions physiques entre les éléments de la LCR 3'IgH et les promoteurs P1/P2 de *c-myc* dans des lignées de BL, montre un rôle direct de ces éléments régulateurs sur l'expression du gène transloqué (Wuerffel et al., 2007). Est-ce que dans notre modèle, la LCR 3'IgH portée par l'épisome aurait été capable de déréguler *c-myc* endogène ?

Un autre mécanisme de dérégulation pourrait être indirect. Nous pouvons imaginer par exemple que la présence du vecteur ppM3124, et donc la LCR 3'IgH, titre des facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation négative de c-Myc endogène. Si tel est le cas, une quantification de l'expression de c-Myc endogène (ou de l'activité d'un gène rapporteur sous la dépendance du promoteur de *c-myc*) en fonction du nombre de copies du vecteur doit théoriquement être possible.

Un troisième mécanisme de dérégulation de *c-myc* est l'accumulation de mutation sur le promoteur et le 1^{er} exon, et ce de façon dépendante de l'enzyme AID impliquée dans les mutations somatiques des gènes des Ig (Pasqualucci et al., 2008; Vincent et al., 2009). Les mutants portant sur les sites de fixation des répresseurs de *c-myc* apparaissent comme sélectionnés lors de la tumorigenèse. Ces mutations acquises altèrent souvent la capacité de c-Myc à induire l'apoptose. En effet, alors que c-Myc est un régulateur positif de la croissance cellulaire et qu'il sensibilise les cellules à l'apoptose dans les cellules normales reflétant le mécanisme d'homéostasie cellulaire, les voies apoptotiques sont altérées dans de nombreux cas de BL. Dans 30% des cas de BL, il s'agit d'une dérégulation affectant la voie p14^{Arf}-MDM2-p53 (Lindstrom and Wiman, 2002). Récemment, il a été montré que lorsque cette voie n'est pas altérée, les cellules de BL sont résistantes à l'apoptose du fait de l'inactivation de la protéine Bim par des mutants de c-Myc retrouvés fréquemment dans les BL (Dang et al., 2005b; Hemann et al., 2005). Il serait donc intéressant d'observer si le locus de *c-myc* est muté ou non, si ce processus de mutation peut être rapporté à AID et si ces mutations altèrent le promoteur et/ou la fonction pro-apoptotique de c-Myc. Si des altérations géniques sont retrouvées, quel est alors le rôle de la LCR-3'IgH dans ce phénomène ?

Nous ne comprenons pas encore les mécanismes mis en jeu dans la "transformation" des cellules EREBppM3124. Cependant, nous avons peut-être là un modèle cellulaire permettant d'étudier la dynamique de la dérégulation de c-Myc lors de cette "transformation". Dès lors, il est clair que la mise au point de transfection de cellules B primaires sera essentielle. L'obtention de

lignées B, issues de cellules primaires, transformées avec nos vecteurs serait un outil novateur pour l'étude de la dérégulation de c-Myc dans la lymphomagenèse.

1.2. C-Myc et NF-κB sont-ils opposés dans la transformation ?

Le facteur NF-κB est impliqué dans l'initiation et la progression tumorale. Les gènes cibles de NF-κB sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la croissance, la survie, mais également dans l'initiation et la progression tumorale (Basseres and Baldwin, 2006). Des mutations aboutissant à l'activation de ce facteur sont fréquemment retrouvées dans les hémopathies malignes (Courtois and Gilmore, 2006).

Cependant, NF-κB semble être réprimé ou du moins diminué dans les BL (dont la croissance dépend de c-Myc). La faible expression des gènes cibles de NF-κB est admise comme une marque de ce type de lymphome (Dave et al., 2006; Hummel et al., 2006). Par exemple, des études ont montré que NF-κB1 (p105/p50) est très faiblement exprimé dans les souris Eμ-Myc et ne serait que faiblement impliqué dans la lymphomagenèse (Keller et al., 2005). D'autre part, sur des lignées cellulaires de lymphomes B dont le programme de prolifération est associé à c-Myc, des auteurs ont montré que c-Myc régule négativement le facteur NF-κB et les gènes de réponse aux interférons en inhibant le facteur STAT1 (Schlee et al., 2007a). Plus récemment, d'autres auteurs ont montré que NF-κB réprime c-Myc dans des modèles murins de lymphomagenèse, puisque son induction bloque la transformation c-Myc dépendante (Klapproth et al., 2009). Ces différentes études issues de la littérature, nous amènent à penser que les facteurs c-Myc et NF-κB sont incompatibles. Or, nous devons étudier la latence des cellules "contrôle" EREB-ppM (comportant *c-myc* sous le seul contrôle du pV_H), mais ce modèle démontre que LMP1, et donc NF-κB, ainsi que c-Myc sont compatibles dans le phénomène de "transformation". Ainsi, nos résultats issus tant du transcriptome que des cellules EREB-ppM ou encore du modèle P493-6 (résultats non montrés), suggèrent clairement que c-Myc et NF-κB ne sont pas toujours incompatibles.

Dans les cellules de BL (EBV en latence I : EBNA1), il semble que c-Myc et NF-κB tendent à se réprimer. Dans les cellules en latence III de l'EBV (EBNA1/2/3A/3B/3C/LP, LMP1, LMP2a/2b), ces deux facteurs pourraient agir de concert dans le phénotype et la physiologie de la cellule. Qu'en est-il lors de la latence II ? Une étude réalisée *in vitro* sur un modèle de carcinomes du rhinopharynx (NPC), en latence II (EBNA1, LMP1, LMP2a/2b) a montré que l'infection par l'EBV active les voies NF-κB et STAT3, ainsi que leurs gènes cibles tel que l'oncogène *c-myc* (Lo et al., 2006). Dans ces modèles de latence II où EBNA 2 est absente, LMP1 pourrait réguler

l'expression de c-Myc. En effet, une étude de transcriptome a montré que c-Myc est une cible de LMP1 (Dirmeier et al., 2005).

La question des latences et l'expression conjointe des deux facteurs c-Myc et NF- κ B se pose également dans un contexte non tumoral, lors de la physiologie de l'infection par l'EBV *in vivo*. Récemment, des auteurs ont proposé que le modèle d'infection par l'EBV *in vivo* mime la physiologie de la différenciation du lymphocyte B (cf. **Figure 38**) (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

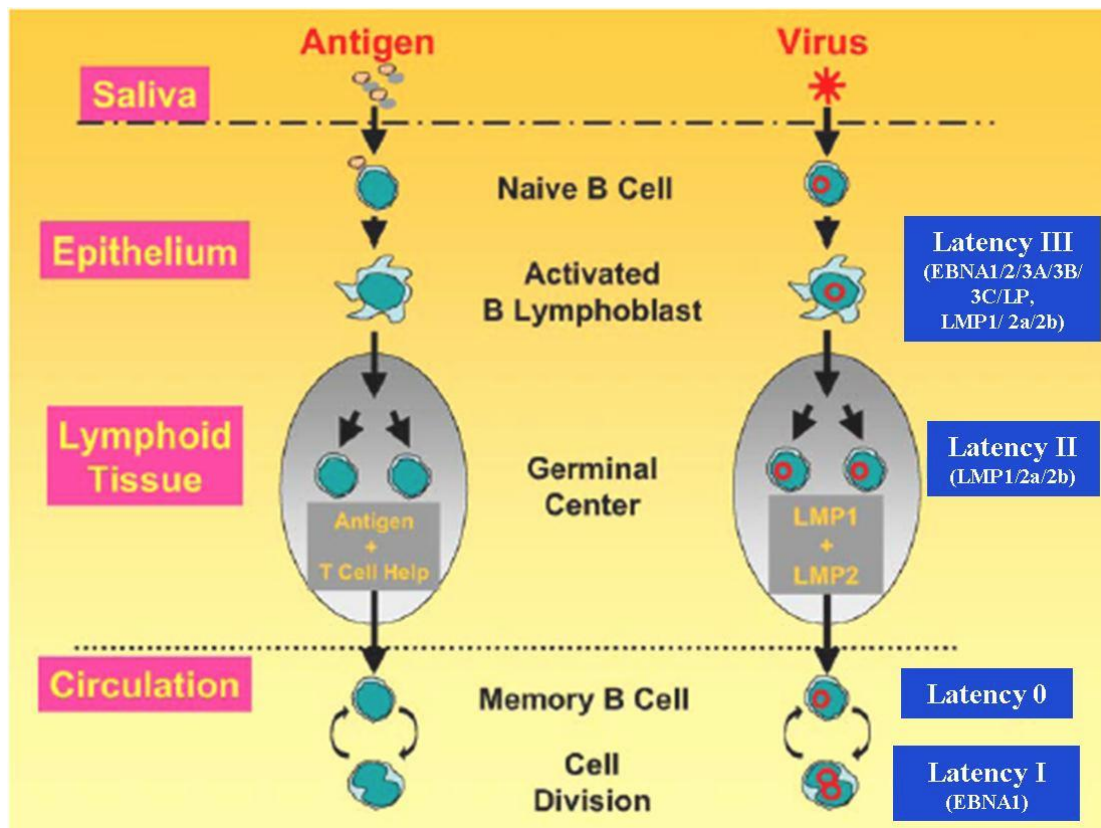


Figure 38 : Modèle de l'infection *in vivo* des lymphocytes B par l'EBV.

D'après (Thorley-Lawson, 2005).

Les étapes de l'infection du lymphocyte B passent par l'expression des différentes latences du virus et donc des protéines associées. Ainsi, qu'en est-il de l'expression des facteurs c-Myc et NF- κ B lors de la différenciation B dans le centre germinatif? Même si les études concernant l'expression de c-Myc sont controversées, c-Myc ne serait pas exprimé dans le centre germinatif (Klein et al., 2003). NF- κ B, quant à lui, est exprimé lors de la différenciation B dépendante de l'antigène de par l'engagement de la voie CD40. Dans le centre germinatif, les deux voies

d'activation de NF- κ B (canonique et non-canonique) sont fonctionnelles, permettant d'engager un signal de survie pour la cellule (Sen, 2006). NF- κ B permet également lors de la différenciation plasmocytaire de réguler positivement le facteur Blimp1 (Johnson et al., 2005). Récemment, la voie NF- κ B a été directement mise en cause dans la genèse de lymphomes, par le biais de mutations affectant l'expression de gènes codant des régulateurs de ce facteur (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009). Lors de l'infection par l'EBV, la cellule B en latence III devient constitutivement activée pour NF- κ B de par LMP1, qui mime la stimulation CD40, et exprime très certainement c-Myc comme les LCLs. Les travaux de N. Faumont dans le laboratoire montrent que la capacité à activer NF- κ B est une propriété commune à tous les variants génétiques naturels de LMP1, quel que soit son degré de mutation, soulignant l'importance de ce facteur dans la physiologie de l'EBV (Faumont et al., 2009a). Des expériences d'infection *in vitro* des cellules B par l'EBV en présence ou non d'aspirine, inhibiteur de NF- κ B, soulignent également son importance dans la biologie de l'EBV (Sugano et al., 1997). La latence de l'EBV dans les cellules du centre germinatif est mal comprise. Certains auteurs comme Thorley-Lawson suggère une latence II (Thorley-Lawson, 2005), donc avec *a priori*, une activation de NF- κ B, mais peut-être pas de c-Myc. D'autres comme R. Kuppers ont montré une latence atypique avec expression de EBNA2 sans LMP1 (Kurth et al., 2003). Or, EBNA2 est potentiellement capable de déréguler c-Myc (Kaiser et al., 1999). Dans les cellules B mémoires, réservoir de l'EBV, la latence de l'EBV est soit 0 (cellules quiescentes), soit I (cellules en division) (Hochberg et al., 2004). Les cellules en latence I et en division expriment sans doute c-Myc, mais NF- κ B n'est certainement pas activé. La réactivation de l'EBV dans les cellules B est associée à la latence II, avec expression de LMP1 et activation de NF- κ B.

Ainsi, c-Myc et NF- κ B coopèrent-ils dans l'immortalisation du lymphocyte B par l'EBV *in vivo* ? Existe-t-il une commutation d'un état "NF- κ B" à un état "c-Myc" activé durant la vie du lymphocyte B immortalisé par l'EBV ? Sont-ils les deux principaux facteurs de transcription aboutissant à la genèse de lymphoproliférations B EBV+ ? Favorisent-ils la mise en jeu d'autres événements génétiques transformants ? Quel est le rôle de l'un par rapport à l'autre ? Coopèrent-ils dans la transformation et l'échappement à la réponse immune ? Des hypothèses peuvent être formulées, mais, à notre connaissance, aucune donnée expérimentale n'a été publiée à ce jour.

1.3. C-Myc/NF- κ B sont-ils anti-immunogène/immunogène ?

Les gènes régulés spécifiquement dans le programme de prolifération associé à la latence III, sont pour la plupart des cibles de NF- κ B ou de c-Myc. Les gènes surexprimés dans la latence III de l'EBV, alors qu'ils sont réprimés par c-Myc, sont : des gènes codant des membres de la famille des

récepteurs au TNF, les molécules TRAF/TRADD, des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et la présentation de l'antigène. Les résultats du transcriptome sont cohérents avec le fait que l'expression de c-Myc diminue l'immunogénicité des cellules B. Dans ce contexte, l'activation de NF- κ B dans les cellules en latence III contrebalance cet effet.

Nos résultats issus du transcriptome, et les travaux du laboratoire suggèrent clairement que LMP1 et NF- κ B sont immunogènes (les molécules CD80 et CD86 sont augmentées dans le programme de prolifération associé à la latence III de l'EBV). Or, nous montrons dans notre étude le rôle réciproque de c-Myc et de l'EBV dans la régulation de l'expression d'une molécule délivrant un signal de co-inhibition de la réponse immune T, lorsqu'elle est exprimée à la surface de cellules cibles (telle une cellule cancéreuse ou une cellule infectée par un virus) : la protéine B7-H1. L'expression de cette protéine à la surface d'une cellule cible, de par l'engagement de son récepteur PD-1 à la surface de la cellule T, entraîne l'anergie voire l'apoptose de la cellule T. Nous montrons que B7-H1 est externalisée par l'EBV, alors que c-Myc diminue son expression membranaire. Ces premiers résultats reposent la question de la balance immunogénicité/échappement à la réponse immunitaire par rapport à ces deux programmes. Quel est le rôle de l'expression de B7-H1 dans un contexte de réponse immune T anti-EBV ? Alors que la latence III est immunogène, est-ce que l'expression de B7-H1 est un mode de détournement de la réponse immune par le virus pour être toléré par l'hôte ? Un modèle simple serait d'admettre que LMP1/NF- κ B augmente l'immunogénicité et que c-Myc la diminue. Cependant, l'étude de la régulation de l'expression de B7-H1 dans les cellules en latence III nous suggère l'inverse.

Enfin, une dernière interrogation se pose. Qu'en est-il de l'expression de B7-H1 lors des autres phases de latence ? Quel est l'effet de l'absence de son expression à la membrane de cellules de BL EBV+ en latence I présentant EBNA1 dans un contexte CMH, notamment de classe I ? Ces questions se posent également lors de l'infection *in vivo* par l'EBV. En effet, nous savons que l'infection virale est associée à une réponse T cytotoxique vigoureuse, qu'en est-il de la régulation de l'expression de B7-H1 lors des différentes étapes de l'infection ?

Ainsi, l'étude de la balance d'expression des molécules de co-signalisation de la réponse immune dans les cellules B nous paraît très intéressante. La lignée cellulaire P493-6 est un excellent modèle pour étudier cette balance exercée par les programmes associés à c-Myc d'une part et à l'EBV d'autre part.

2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux menés durant ma thèse a montré tout d'abord que c-Myc et NF- κ B sont les deux principaux facteurs transcriptionnels activés dans les cellules B EBV+ en latence III. Contrairement à ce qui pouvait être supposé d'après la littérature, nous montrons que le programme de prolifération associé à *c-myc* n'est pas incompatible avec le programme de prolifération associé à la latence III de l'EBV, dépendant d'EBNA2. Suite à cette étude et d'autres travaux réalisés au sein du laboratoire, montrant notamment le rôle ambivalent de l'oncogène LMP1 de l'EBV, nous avons entrepris l'étude de la régulation de l'expression de B7-H1, molécule de co-signalisation de la réponse immune, dans les cellules B EBV+. Les premiers résultats nous montrent que l'EBV et c-Myc régulent l'expression de B7-H1 de façon réciproque, l'EBV l'induisant, c-Myc la réprimant. Cette régulation s'effectue au niveau transcriptionnel, mais également au niveau de l'externalisation de la molécule B7-H1. Cette observation est surprenante au regard de la littérature et de nos précédents travaux, puisqu'il est admis que l'EBV est associé à une augmentation de l'immunogénicité des cellules, alors que c-Myc la diminue, et que l'expression de B7-H1 à la membrane d'une cellule tumorale inhibe la réponse immune T. Par ailleurs, nous avons élaboré de nouveaux outils moléculaires permettant de transformer le lymphocyte B. Ces nouveaux vecteurs présentent, théoriquement, le double intérêt de permettre d'évaluer l'activité transcriptionnelle de régions régulatrices impliquées dans la dérégulation d'oncogènes, mais également de tester le pouvoir transformant d'oncogènes lorsqu'ils sont placés sous la dépendance de ces régions. Les premiers résultats nous font redécouvrir que c-Myc est associé à la transformation des lymphocytes B, mais de nombreuses questions restent ouvertes quant au mode de fonctionnement de ces nouveaux vecteurs.

S'agissant de la compréhension des mécanismes de la lymphomagenèse impliquant c-Myc dans le contexte de l'infection de la cellule B par le virus d'Epstein-Barr, et donc le facteur NF- κ B, deux questions clefs se posent à l'issue de ces travaux.

Ces deux facteurs coopèrent-ils dans les processus de transformation ? Pourquoi dans les cas de BL, ces deux facteurs apparaissent antinomiques ? Pourquoi ne le sont-ils pas dans les LCLs en latence III, et sans doute pas dans les PTLD et dans les lymphomes B immunoblastiques de l'individu immunocompétent ?

Quels sont les déterminants cellulaires de l'immunogénicité des cellules B EBV+ ? La latence III n'a lieu *in vivo* que dans le cadre de PTLD, et est donc associée à un déficit immunitaire. Quel est le rôle des molécules de co-signalisation par rapport à la forte réponse immune T anti-EBV retrouvée lors de l'infection ? Comment sont-elles régulées par les facteurs c-Myc et NF-κB ?

Ces deux questions constituent actuellement deux axes de réflexion de notre équipe de recherche. Des projets sont en cours d'élaboration afin d'étudier directement la coopération entre ces deux facteurs dans la prolifération et leur anti-coopération dans l'immunogénicité des cellules. Une des perspectives majeures est l'élaboration d'un modèle murin mimant les lymphomes B diffus à grandes cellules de type immunoblastique par le croisement de souris *c-myc-LCR* (mimant la translocation retrouvée dans le BL) (Truffinet et al., 2007) et de souris *lmp1/cd40* (mimant l'activation constitutive de NF-κB) (Homig-Holzel et al., 2008). Ces modèles murins permettront d'observer la cinétique d'apparition des tumeurs impliquant c-Myc et NF-κB.

L'émergence d'une cellule B maligne et de la progression tumorale dépend non seulement d'évènements géniques transformants, telle que la translocation chromosomique, mais également de signaux de survie délivrés par l'expression d'un BCR fonctionnel et d'interactions avec le microenvironnement tumoral. Ces travaux de thèse, ceux du laboratoire et de très nombreux autres rapportés dans la littérature, démontrent la "puissance" du modèle EBV. Dans ce cadre, mes travaux sur l'implication de c-Myc dans la lymphomagenèse B dans un contexte d'infection par l'EBV ont ouvert de nouveaux champs d'investigations quant à la dérégulation de c-Myc et son rôle dans l'immunogénicité, questions auxquelles nous espérons répondre rapidement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L. and Min, W.P.: Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 35 (2005) 169-73.
- Adachi, S., Obaya, A.J., Han, Z., Ramos-Desimone, N., Wyche, J.H. and Sedivy, J.M.: c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G(2) phase of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 4929-37.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L.: The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318 (1985) 533-8.
- Adhikary, S. and Eilers, M.: Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 635-45.
- Adriaenssens, E., Mougél, A., Goormachtigh, G., Loing, E., Fafeur, V., Auriault, C. and Coll, J.: A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. *Oncogene* 23 (2004) 2681-93.
- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A. and Oltz, E.M.: Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol* 176 (2006) 2439-47.
- Aguilera, R.J., Hope, T.J. and Sakano, H.: Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *Embo J* 4 (1985) 3689-93.
- Alexandrova, N., Niklinski, J., Bliskovsky, V., Otterson, G.A., Blake, M., Kaye, F.J. and Zajac-Kaye, M.: The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 5188-95.
- Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H.: Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72 (1993a) 233-45.
- Amati, B., Dalton, S., Brooks, M.W., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H.: Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359 (1992) 423-6.
- Amati, B., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H.: The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J* 12 (1993b) 5083-7.
- Andersson, T., Furebring, C., Borrebaeck, C.A. and Pettersson, S.: Temporal expression of a V(H) promoter-Cmu transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol Immunol* 36 (1999) 19-29.
- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E. and Allday, M.J.: Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27 (2008) 421-33.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.I. and Calame, K.: Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* 165 (2000) 5462-71.
- Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J. and Liu, Y.J.: Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268 (1995) 720-2.

- Arsura, M., Deshpande, A., Hann, S.R. and Sonenshein, G.E.: Variant Max protein, derived by alternative splicing, associates with c-Myc in vivo and inhibits transactivation. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 6702-9.
- Arulampalam, V., Grant, P.A., Samuelsson, A., Lendahl, U. and Pettersson, S.: Lipopolysaccharide-dependent transactivation of the temporally regulated immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Eur J Immunol* 24 (1994) 1671-7.
- Arvanitis, C. and Felsher, D.W.: Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 313-7.
- Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C. and Cleveland, J.L.: Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6 (1991) 1915-22.
- Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N.: Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72 (1993) 211-22.
- Bahler, D.W. and Levy, R.: Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 6770-4.
- Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K. and Robertson, E.S.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol* 82 (2008) 4082-90.
- Banerji, J., Olson, L. and Schaffner, W.: A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33 (1983) 729-40.
- Bao, J. and Zervos, A.S.: Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene* 12 (1996) 2171-6.
- Baran-Marszak, F., Feuillard, J., Najjar, I., Le Clorennec, C., Bechet, J.M., Dusanter-Fourt, I., Bornkamm, G.W., Raphael, M. and Fagard, R.: Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood* 104 (2004) 2475-83.
- Barr, L.F., Campbell, S.E., Bochner, B.S. and Dang, C.V.: Association of the decreased expression of alpha3beta1 integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-myc-overexpressing small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 58 (1998) 5537-45.
- Barr, L.F., Campbell, S.E., Diette, G.B., Gabrielson, E.W., Kim, S., Shim, H. and Dang, C.V.: c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 60 (2000) 143-9.
- Basseres, D.S. and Baldwin, A.S.: Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25 (2006) 6817-30.
- Baxendale, A.J., Dawson, C.W., Stewart, S.E., Mudaliar, V., Reynolds, G., Gordon, J., Murray, P.G., Young, L.S. and Eliopoulos, A.G.: Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene* 24 (2005) 7913-23.
- Bebin, A.G., Cogne, M., Cogne, N., Carrion, C., Lecardeur, S. and Pinaud, E.: *In vivo* redundant function of the 3'IgH regulatory element HS3b in the mouse. *Journal of Immunology*, In revision. (2009).
- Beier, R., Burgin, A., Kiermaier, A., Fero, M., Karsunky, H., Saffrich, R., Moroy, T., Ansorge, W., Roberts, J. and Eilers, M.: Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent

- transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *Embo J* 19 (2000) 5813-23.
- Bentley, D.L. and Groudine, M.: Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 3481-9.
- Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E. and Adams, J.M.: Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *Embo J* 2 (1983) 2375-83.
- Bernstein, P.L., Herrick, D.J., Prokipcak, R.D. and Ross, J.: Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev* 6 (1992) 642-54.
- Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R. and Magrath, I.: Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat Genet* 5 (1993) 56-61.
- Bidwell, G.L., 3rd and Raucher, D.: Enhancing the antiproliferative effect of topoisomerase II inhibitors using a polypeptide inhibitor of c-Myc. *Biochem Pharmacol* 71 (2006) 248-56.
- Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N. and Weintraub, H.: Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250 (1990) 1149-51.
- Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N.: Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251 (1991) 1211-7.
- Blackwood, E.M., Luscher, B. and Eisenman, R.N.: Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* 6 (1992) 71-80.
- Blank, C., Kuball, J., Voelkl, S., Wiendl, H., Becker, B., Walter, B., Majdic, O., Gajewski, T.F., Theobald, M., Andreesen, R. and Mackensen, A.: Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 119 (2006) 317-27.
- Blum, K.A., Lozanski, G. and Byrd, J.C.: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104 (2004) 3009-20.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J. and Corcoran, A.E.: Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat Immunol* 5 (2004) 630-7.
- Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., Bertoletti, A. and Ferrari, C.: Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81 (2007) 4215-25.
- Bornkamm, G.W.: Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* (2009a).
- Bornkamm, G.W.: Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer* 124 (2009b) 1745-55.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. and Feuillard, J.: Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) e137.
- Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W.: Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (2001) 437-59.

- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M. and Schmitt, C.A.: FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* 21 (2007) 2775-87.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M.: Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18 (1999) 5321-33.
- Boxer, L.M. and Dang, C.V.: Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20 (2001) 5595-610.
- Brennan, P., Mehl, A.M., Jones, M. and Rowe, M.: Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene* 21 (2002) 1263-71.
- Brewer, G. and Ross, J.: Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 8 (1988) 1697-708.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. and Bishop, J.M.: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224 (1984) 1121-4.
- Bucci, B., D'Agnano, I., Amendola, D., Citti, A., Raza, G.H., Miceli, R., De Paula, U., Marchese, R., Albin, S., Felsani, A., Brunetti, E. and Vecchione, A.: Myc down-regulation sensitizes melanoma cells to radiotherapy by inhibiting MLH1 and MSH2 mismatch repair proteins. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 2756-67.
- Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E. and Longnecker, R.: An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol* 66 (1992) 5161-7.
- Butch, A.W., Chung, G.H., Hoffmann, J.W. and Nahm, M.H.: Cytokine expression by germinal center cells. *J Immunol* 150 (1993) 39-47.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H. and Freeman, G.J.: Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27 (2007) 111-22.
- Butzler, C., Zou, X., Popov, A.V. and Bruggemann, M.: Rapid induction of B-cell lymphomas in mice carrying a human IgH/c-mycYAC. *Oncogene* 14 (1997) 1383-8.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. and Longnecker, R.: Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9 (1998) 405-11.
- Capello, D., Cerri, M., Muti, G., Lucioni, M., Oreste, P., Gloghini, A., Berra, E., Deambrogi, C., Franceschetti, S., Rossi, D., Alabiso, O., Morra, E., Rambaldi, A., Carbone, A., Paulli, M. and Gaidano, G.: Analysis of immunoglobulin heavy and light chain variable genes in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Hematol Oncol* 24 (2006) 212-9.
- Carsetti, L., Laurenti, L., Gobessi, S., Longo, P.G., Leone, G. and Efremov, D.G.: Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation. *Cell Signal* 21 (2009) 1187-94.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. and Werner, T.: MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21 (2005) 2933-42.
- Challa, A., Eliopoulos, A.G., Holder, M.J., Burguete, A.S., Pound, J.D., Chamba, A., Grafton, G., Armitage, R.J., Gregory, C.D., Martinez-Valdez, H., Young, L. and Gordon, J.: Population

- depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells. *Blood* 99 (2002) 3411-8.
- Chang, D.W., Claassen, G.F., Hann, S.R. and Cole, M.D.: The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 4309-19.
- Chaudhuri, J. and Alt, F.W.: Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 541-52.
- Chauveau, C. and Cogne, M.: Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* 14 (1996) 15-6.
- Chauveau, C., Jansson, E.A., Muller, S., Cogne, M. and Pettersson, S.: Cutting edge: Ig heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position-independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J Immunol* 163 (1999) 4637-41.
- Chauveau, C., Pinaud, E. and Cogne, M.: Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur J Immunol* 28 (1998) 3048-56.
- Chen, C. and Birshstein, B.K.: Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol* 159 (1997) 1310-8.
- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K. and Alt, F.W.: Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *Embo J* 12 (1993) 4635-45.
- Chen, L., Zhang, Z., Chen, W., Zhang, Z., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Chen, L., Wang, S. and Wang, F.S.: B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 178 (2007) 6634-41.
- Cheng, S.W., Davies, K.P., Yung, E., Beltran, R.J., Yu, J. and Kalpana, G.V.: c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* 22 (1999) 102-5.
- Chou, T.Y., Dang, C.V. and Hart, G.W.: Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995a) 4417-21.
- Chou, T.Y., Hart, G.W. and Dang, C.V.: c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270 (1995b) 18961-5.
- Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M.D., Hobot, J.A., Newman, G.R. and Jasani, B.: Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods* 247 (2001) 163-74.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. and Busslinger, M.: Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8 (2007) 463-70.
- Cobbold, L.C., Spriggs, K.A., Haines, S.J., Dobbyn, H.C., Hayes, C., de Moor, C.H., Lilley, K.S., Bushell, M. and Willis, A.E.: Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol Cell Biol* 28 (2008) 40-9.
- Cogné, M. and Birshstein, B.K.: Regulation of Class Switch Recombination. In: Honjo, T., Alt, F.W. and Neuberger, M.S. (Eds.), *Molecular biology of B cells*. Elsevier, London, 2004, pp. 289-305.

- Cogne, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L. and Alt, F.W.: A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77 (1994) 737-47.
- Cohen, J.I., Wang, F. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol* 65 (1991) 2545-54.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 9558-62.
- Cole, M.D. and Cowling, V.H.: Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 810-5.
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R. and Pasqualucci, L.: Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459 (2009) 717-21.
- Corcoran, A.E.: Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17 (2005) 141-54.
- Courtois, G. and Gilmore, T.D.: Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25 (2006) 6831-43.
- Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L. and Cole, M.D.: A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* 26 (2006) 4226-39.
- Cowling, V.H. and Cole, M.D.: Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 242-52.
- Croce, C.M. and Calin, G.A.: miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 122 (2005) 6-7.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C. and Croce, C.M.: Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982a) 7824-7.
- Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F. and Gallo, R.C.: Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299 (1982b) 61-3.
- Dang, C.V.: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1-11.
- Dang, C.V., Li, F. and Lee, L.A.: Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? *Cell Cycle* 4 (2005a) 1465-6.
- Dang, C.V., O'Donnell K, A. and Juopperi, T.: The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* 8 (2005b) 177-8.
- Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C. and Li, F.: The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 253-64.
- Dariavach, P., Williams, G.T., Campbell, K., Pettersson, S. and Neuberger, M.S.: The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur J Immunol* 21 (1991) 1499-504.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Rimsza, L.M., Braziel, R.M., Grogan, T.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Dave, B.J., Sanger, W., Bast, M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Connors, J.M., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H.,

- Fisher, R.I., Miller, T.P., Montserrat, E., Wilson, W.H., Bahl, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Simon, R., Chan, W.C. and Staudt, L.M.: Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354 (2006) 2431-42.
- Dawson, C.W., Laverick, L., Morris, M.A., Tramoutanis, G. and Young, L.S.: Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* 82 (2008) 3654-64.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E.J., Coovadia, H.M., Goulder, P.J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G.J. and Walker, B.D.: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443 (2006) 350-4.
- De Alboran, I.M., Baena, E. and Martinez, A.C.: c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ* 11 (2004) 61-8.
- Denizot, Y., Pinaud, E., Aupetit, C., Le Morvan, C., Magnoux, E., Aldigier, J.C. and Cogne, M.: Polymorphism of the human alpha 1 immunoglobulin gene 3' enhancer hs1,2 and its relation to gene expression. *Immunology* 103 (2001) 35-40.
- Denny, C.T., Hollis, G.F., Magrath, I.T. and Kirsch, I.R.: Burkitt lymphoma cell line carrying a variant translocation creates new DNA at the breakpoint and violates the hierarchy of immunoglobulin gene rearrangement. *Mol Cell Biol* 5 (1985) 3199-207.
- Di Noia, J.M. and Neuberger, M.S.: Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76 (2007) 1-22.
- Dighiero, G., Hart, S., Lim, A., Borche, L., Levy, R. and Miller, R.A.: Autoantibody activity of immunoglobulins isolated from B-cell follicular lymphomas. *Blood* 78 (1991) 581-5.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. and Hammerschmidt, W.: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 24 (2005) 1711-7.
- Dogan, A., Du, M.Q., Aiello, A., Diss, T.C., Ye, H.T., Pan, L.X. and Isaacson, P.G.: Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood* 91 (1998) 4708-14.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E. and Chen, L.: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8 (2002) 793-800.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L.: B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5 (1999) 1365-9.
- Doyen, N., Dreyfus, M. and Rougeon, F.: Regulatory elements involved in the bidirectional activity of an immunoglobulin promoter. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 1977-87.
- Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F.: The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *Embo J* 6 (1987) 1685-90.
- Dukers, D.F., Meij, P., Vervoort, M.B., Vos, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J., Bloemena, E. and Middeldorp, J.M.: Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* 165 (2000) 663-70.

- Duquette, M.L., Pham, P., Goodman, M.F. and Maizels, N.: AID binds to transcription-induced structures in c-MYC that map to regions associated with translocation and hypermutation. *Oncogene* 24 (2005) 5791-8.
- Eaton, S. and Calame, K.: Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7634-8.
- Edry, E. and Melamed, D.: Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* 173 (2004) 4265-71.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P. and Cory, S.: Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 6164-9.
- Eick, D. and Bornkamm, G.W.: Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression. *Nucleic Acids Res* 14 (1986) 8331-46.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K.R. and Bishop, J.M.: Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 340 (1989) 66-8.
- Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F. and Cleveland, J.L.: Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 5063-70.
- Eliopoulos, A.G., Caamano, J.H., Flavell, J., Reynolds, G.M., Murray, P.G., Poyet, J.L. and Young, L.S.: Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* 22 (2003) 7557-69.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. and Young, L.S.: Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274 (1999) 16085-96.
- Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M. and Young, L.S.: Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14 (1997) 2899-916.
- Eliopoulos, A.G. and Young, L.S.: LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 11 (2001) 435-44.
- Eliopoulos, A.G. and Young, L.S.: The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 4 (2004) 360-7.
- Eppihimer, M.J., Gunn, J., Freeman, G.J., Greenfield, E.A., Chernova, T., Erickson, J. and Leonard, J.P.: Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 9 (2002) 133-45.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.: Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1 (1964) 702-3.
- Erikson, J., Finan, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M.: Translocation of immunoglobulin VH genes in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 5611-5.
- Ernst, P. and Smale, S.T.: Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2 (1995) 427-38.

- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. and Hancock, D.C.: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69 (1992) 119-28.
- Facchini, L.M., Chen, S., Marhin, W.W., Lear, J.N. and Penn, L.Z.: The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 100-14.
- Facchini, L.M. and Penn, L.Z.: The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* 12 (1998) 633-51.
- Faumont, N., Chanut, A., Benard, A., Cogne, N., Delsol, G., Feuillard, J. and Meggetto, F.: Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica* 94 (2009a) 355-63.
- Faumont, N., Durand-Panteix, S., Schlee, M., Gromminger, S., Schuhmacher, M., Holzel, M., Laux, G., Mailhammer, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Bornkamm, G.W. and Feuillard, J.: c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 83 (2009b) 5014-27.
- Felsher, D.W. and Bishop, J.M.: Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4 (1999a) 199-207.
- Felsher, D.W. and Bishop, J.M.: Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999b) 3940-4.
- Ferguson, S.E., Han, S., Kelsoe, G. and Thompson, C.B.: CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 156 (1996) 4576-81.
- Feuillard, J. and Raphaël, M.: Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie* 6 (2000) 345-59.
- Flanagan, J., Middeldorp, J. and Sculley, T.: Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol* 84 (2003) 1871-9.
- Francis, S.M., Bergsied, J., Isaac, C.E., Coschi, C.H., Martens, A.L., Hojilla, C.V., Chakrabarti, S., Dimattia, G.E., Khoka, R., Wang, J.Y. and Dick, F.A.: A functional connection between pRB and transforming growth factor beta in growth inhibition and mammary gland development. *Mol Cell Biol* 29 (2009) 4455-66.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R. and Honjo, T.: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192 (2000) 1027-34.
- Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I. and Watt, F.M.: Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130 (2003) 2793-808.
- Fukuda, M. and Longnecker, R.: Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol* 79 (2005) 8655-60.
- Fulton, R. and van Ness, B.: Selective synergy of immunoglobulin enhancer elements in B-cell development: a characteristic of kappa light chain enhancers, but not heavy chain enhancers. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 4216-23.

- Furman, R.R., Asgary, Z., Mascarenhas, J.O., Liou, H.C. and Schattner, E.J.: Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 164 (2000) 2200-6.
- Fuxa, M. and Skok, J.A.: Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol* 19 (2007) 129-36.
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J.L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. and van Dongen, J.J.: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17 (2003) 2318-57.
- Gan, Y.J., Razzouk, B.I., Su, T. and Sixbey, J.W.: A defective, rearranged Epstein-Barr virus genome in EBER-negative and EBER-positive Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 160 (2002) 781-6.
- Gandarillas, A. and Watt, F.M.: c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11 (1997) 2869-82.
- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenkova, V.V. and Birshtein, B.K.: Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 1511-25.
- Garrone, P., Neidhardt, E.M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C. and Banchereau, J.: Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 182 (1995) 1265-73.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R. and Eilers, M.: Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *Embo J* 14 (1995) 1508-19.
- Geng, L., Jiang, G., Fang, Y., Dong, S., Xie, H., Chen, Y., Shen, M. and Zheng, S.: B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14+ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels. *J Viral Hepat* 13 (2006) 725-33.
- Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G. and Birshtein, B.K.: DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J Immunol* 150 (1993) 1772-80.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W.: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* 16 (1997) 6131-40.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N. and White, R.J.: Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421 (2003) 290-4.
- Gonda, T.J. and Metcalf, D.: Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. *Nature* 310 (1984) 249-51.
- Grassilli, E., Ballabeni, A., Maellaro, E., Del Bello, B. and Helin, K.: Loss of MYC confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis by preventing the activation of multiple serine protease- and caspase-mediated pathways. *J Biol Chem* 279 (2004) 21318-26.

- Greenbaum, S., Lazorchak, A.S. and Zhuang, Y.: Differential functions for the transcription factor E2A in positive and negative gene regulation in pre-B lymphocytes. *J Biol Chem* 279 (2004) 45028-35.
- Gregor, P.D. and Morrison, S.L.: Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 1903-16.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K. and Dalla-Favera, R.: Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *Embo J* 9 (1990) 3913-22.
- Gronbaek, K., Straten, P.T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M.K., Hansen, N.E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K. and Guldborg, P.: Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92 (1998) 3018-24.
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R. and Kieff, E.: The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 7568-72.
- Gu, W., Bhatia, K., Magrath, I.T., Dang, C.V. and Dalla-Favera, R.: Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* 264 (1994) 251-4.
- Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L. and Amati, B.: Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8 (2006) 764-70.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogne, M. and Denizot, Y.: Insulators to improve expression of a 3' IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 307 (2003) 466-71.
- Guglielmi, L., Truffinet, V., Magnoux, E., Cogne, M. and Denizot, Y.: The polymorphism of the locus control region lying downstream the human IgH locus is restricted to hs1,2 but not to hs3 and hs4 enhancers. *Immunol Lett* 94 (2004) 77-81.
- Habib, T., Park, H., Tsang, M., de Alboran, I.M., Nicks, A., Wilson, L., Knoepfler, P.S., Andrews, S., Rawlings, D.J., Eisenman, R.N. and Iritani, B.M.: Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J Cell Biol* 179 (2007) 717-31.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B.: Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340 (1989) 393-7.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. and Baichwal, V.R.: The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* 63 (1989) 2469-75.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70.
- Hann, S.R.: Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 288-302.
- Hann, S.R. and Eisenman, R.N.: Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 4 (1984) 2486-97.
- Harada, S. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71 (1997) 6611-8.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. and et al.: A revised European-American classification

- of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84 (1994) 1361-92.
- Hayflick, L.: Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62 (1997) 1180-90.
- Hayward, W.S., Neel, B.G. and Astrin, S.M.: Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290 (1981) 475-80.
- He, X.H., Xu, L.H. and Liu, Y.: Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain. *Acta Pharmacol Sin* 26 (2005) 462-8.
- Hecht, J.L. and Aster, J.C.: Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3707-21.
- Heckman, C.A., Cao, T., Somsouk, L., Duan, H., Mehew, J.W., Zhang, C.Y. and Boxer, L.M.: Critical elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancers for deregulated expression of bcl-2. *Cancer Res* 63 (2003) 6666-73.
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P. and Lowe, S.W.: Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436 (2005) 807-11.
- Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W. and Tansey, W.P.: A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6 (2005) 177-83.
- Hermeking, H., Wolf, D.A., Kohlhuber, F., Dickmanns, A., Billaud, M., Fanning, E. and Eick, D.: Role of c-myc in simian virus 40 large tumor antigen-induced DNA synthesis in quiescent 3T3-L1 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10412-6.
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D.B., Lau, J.S., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L.: Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65 (2005) 1089-96.
- Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D. and Rickinson, A.B.: Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25 (2007) 587-617.
- Hochberg, D., Middeldorp, J.M., Catalina, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K. and Thorley-Lawson, D.A.: Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 239-44.
- Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D.A.: Suppression of c-myc and c-myb is tightly linked to terminal differentiation induced by IL6 or LIF and not growth inhibition in myeloid leukemia cells. *Oncogene* 6 (1991) 903-9.
- Hoffman, B. and Liebermann, D.A.: Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27 (2008) 6462-72.
- Holt, J.T., Redner, R.L. and Nienhuis, A.W.: An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 8 (1988) 963-73.
- Homig-Holzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Muller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K. and Zimmer-Strobl, U.: Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med* 205 (2008) 1317-29.
- Hsieh, J.J. and Hayward, S.D.: Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268 (1995) 560-3.

- Hu, H.M., Kanda, K., Zhang, L. and Boxer, L.M.: Activation of the c-myc p1 promoter in Burkitt's lymphoma by the hs3 immunoglobulin heavy-chain gene enhancer. *Leukemia* 21 (2007) 747-53.
- Hu, Y., Pan, Q., Pardali, E., Mills, F.C., Bernstein, R.M., Max, E.E., Sideras, P. and Hammarstrom, L.: Regulation of germline promoters by the two human Ig heavy chain 3' alpha enhancers. *J Immunol* 164 (2000) 6380-6.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. and Rowe, M.: The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10 (1995) 549-60.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.J., Bousset, K., Hammerschmidt, W. and Schepers, A.: The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 10989-94.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kuhn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Sturzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H. and Siebert, R.: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354 (2006) 2419-30.
- Hurlin, P.J., Queva, C. and Eisenman, R.N.: Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev* 11 (1997) 44-58.
- Hurlin, P.J., Queva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Eisenman, R.N.: Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* 14 (1995) 5646-59.
- Iaccarino, I., Hancock, D., Evan, G. and Downward, J.: c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner. *Cell Death Differ* 10 (2003) 599-608.
- Iba, T., Kigawa, J., Kanamori, Y., Itamochi, H., Oishi, T., Simada, M., Uegaki, K., Naniwa, J. and Terakawa, N.: Expression of the c-myc gene as a predictor of chemotherapy response and a prognostic factor in patients with ovarian cancer. *Cancer Sci* 95 (2004) 418-23.
- Iritani, B.M., Delrow, J., Grandori, C., Gomez, I., Klacking, M., Carlos, L.S. and Eisenman, R.N.: Modulation of T-lymphocyte development, growth and cell size by the Myc antagonist and transcriptional repressor Mad1. *Embo J* 21 (2002) 4820-30.
- Iritani, B.M. and Eisenman, R.N.: c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13180-5.
- Iyengar, R.V., Pawlik, C.A., Krull, E.J., Phelps, D.A., Burger, R.A., Harris, L.C., Potter, P.M. and Danks, M.K.: Use of a modified ornithine decarboxylase promoter to achieve efficient c-MYC- or N-MYC-regulated protein expression. *Cancer Res* 61 (2001) 3045-52.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H. and Isaacson, P.G.: Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112 (2008) 4384-99.

- Johnson, K., Shapiro-Shelef, M., Tunyaplin, C. and Calame, K.: Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Mol Immunol* 42 (2005) 749-61.
- Johnson, P.W., Watt, S.M., Betts, D.R., Davies, D., Jordan, S., Norton, A.J. and Lister, T.A.: Isolated follicular lymphoma cells are resistant to apoptosis and can be grown in vitro in the CD40/stromal cell system. *Blood* 82 (1993) 1848-57.
- Johnston, L.A., Prober, D.A., Edgar, B.A., Eisenman, R.N. and Gallant, P.: *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell* 98 (1999) 779-90.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B.: The proto-oncogene *c-myc* is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 73 (1999) 4481-4.
- Kanda, K., Hu, H.M., Zhang, L., Grandchamps, J. and Boxer, L.M.: NF-kappa B activity is required for the deregulation of *c-myc* expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J Biol Chem* 275 (2000) 32338-46.
- Kaplan, M.H., Zong, R.T., Herrscher, R.F., Scheuermann, R.H. and Tucker, P.W.: Transcriptional activation by a matrix associating region-binding protein. contextual requirements for the function of bright. *J Biol Chem* 276 (2001) 21325-30.
- Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G. and Szekely, L.: EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int J Cancer* 105 (2003) 644-53.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y. and Ogawa, S.: Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459 (2009) 712-6.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H.: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26 (2008) 677-704.
- Keller, U., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., Old, J.B. and Cleveland, J.L.: Nfkb 1 is dispensable for Myc-induced lymphomagenesis. *Oncogene* 24 (2005) 6231-40.
- Kelly, G., Bell, A. and Rickinson, A.: Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med* 8 (2002) 1098-104.
- Kelly, G.L., Milner, A.E., Baldwin, G.S., Bell, A.I. and Rickinson, A.B.: Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in *c-myc*-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 14935-40.
- Kelly, G.L., Milner, A.E., Tierney, R.J., Croom-Carter, D.S., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A.I. and Rickinson, A.B.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol* 79 (2005) 10709-17.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P.: Cell-specific regulation of the *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35 (1983) 603-10.
- Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W.: B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J* 14 (1995) 88-96.

- Kennedy, G., Komano, J. and Sugden, B.: Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 14269-74.
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquere, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J. and Busson, P.: Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6 (2006) 283.
- Khamlichi, A.A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C. and Cogne, M.: The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol* 75 (2000) 317-45.
- Khanna, R., Slade, R.W., Poulsen, L., Moss, D.J., Burrows, S.R., Nicholls, J. and Burrows, J.M.: Evolutionary dynamics of genetic variation in Epstein-Barr virus isolates of diverse geographical origins: evidence for immune pressure-independent genetic drift. *J Virol* 71 (1997) 8340-6.
- Kieff, E.: Epstein-Barr virus and its replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M., *Fields Virology*, vol 2., 3rd ed, 1996.
- Kieff, E. and Rickinson, A.B.: Epstein-Barr virus and its replication, In Knipe, D.M. and Howley, P.M., *Fields Virology*, vol 22., 4th ed, 2001.
- Kim, Y.S., Park, G.B., Lee, H.K., Song, H., Choi, I.H., Lee, W.J. and Hur, D.Y.: Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J Immunol* 181 (2008) 6158-69.
- Klapproth, K., Sander, S., Marinkovic, D., Baumann, B. and Wirth, T.: The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* 114 (2009) 2448-58.
- Klefstrom, J., Arighi, E., Littlewood, T., Jaattela, M., Saksela, E., Evan, G.I. and Alitalo, K.: Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF- κ B activation. *Embo J* 16 (1997) 7382-92.
- Klein, S., Sablitzky, F. and Radbruch, A.: Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *Embo J* 3 (1984) 2473-6.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K. and Dalla-Favera, R.: Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7 (2006) 773-82.
- Klein, U. and Dalla-Favera, R.: Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 22-33.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. and Dalla-Favera, R.: Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 2639-44.
- Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S. and Eilers, M.: Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 302 (2006) 51-62.
- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Moulec, S.L., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., Adhikary, D., Mautner, J. and Busson, P.: Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113 (2009) 1957-66.
- Knoepfler, P.S., Zhang, X.Y., Cheng, P.F., Gafken, P.R., McMahon, S.B. and Eisenman, R.N.: Myc influences global chromatin structure. *Embo J* 25 (2006) 2723-34.

- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T. and Takada, K.: Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73 (1999) 9827-31.
- Kotani, A., Kakazu, N., Tsuruyama, T., Okazaki, I.M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Nagaoka, H., Yabe, D. and Honjo, T.: Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 1616-20.
- Kottmann, A.H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P.J. and Kohler, G.: A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur J Immunol* 24 (1994) 817-21.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G.W., Janz, S. and Morse, H.C., 3rd: Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 192 (2000) 1183-90.
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N. and Rajewsky, K.: Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117 (2004) 787-800.
- Kumagai, T., Tanio, Y., Osaki, T., Hosoe, S., Tachibana, I., Ueno, K., Kijima, T., Horai, T. and Kishimoto, T.: Eradication of Myc-overexpressing small cell lung cancer cells transfected with herpes simplex virus thymidine kinase gene containing Myc-Max response elements. *Cancer Res* 56 (1996) 354-8.
- Kuo, T.C., Shaffer, A.L., Haddad, J., Jr., Choi, Y.S., Staudt, L.M. and Calame, K.: Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *J Exp Med* 204 (2007) 819-30.
- Kuppers, R.: B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 801-12.
- Kuppers, R.: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 251-62.
- Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20 (2001) 5580-94.
- Kurth, J., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and Kuppers, R.: Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 4730-5.
- Lafferty, K.J. and Cunningham, A.J.: A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53 (1975) 27-42.
- Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304 (1983) 596-602.
- Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Muller, U., McConnell, F. and Kosco-Vilbois, M.: B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T cells. *J Exp Med* 179 (1994) 819-30.
- Larsson, L.G., Pettersson, M., Oberg, F., Nilsson, K. and Luscher, B.: Expression of mad, mx1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* 9 (1994) 1247-52.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H. and

- Freeman, G.J.: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2 (2001) 261-8.
- Laurencikiene, J., Deveikaite, V. and Severinson, E.: HS1,2 enhancer regulation of germline epsilon and gamma2b promoters in murine B lymphocytes: evidence for specific promoter-enhancer interactions. *J Immunol* 167 (2001) 3257-65.
- Le Clorennec, C., Ouk, T.S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C.C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimber-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J. and Jayat-Vignoles, C.: Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J Virol* 82 (2008) 6721-33.
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W. and Feuillard, J.: EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* 107 (2006) 2070-8.
- LeBien, T.W.: Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96 (2000) 9-23.
- Lee, S.J., Jang, B.C., Lee, S.W., Yang, Y.I., Suh, S.I., Park, Y.M., Oh, S., Shin, J.G., Yao, S., Chen, L. and Choi, I.H.: Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett* 580 (2006) 755-62.
- Lefranc, M.-P. and Lefranc, G.: Génétique Moléculaire des Immunoglobulines. In: *IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®*, <http://www.imgt.org>. Montpellier, France, 2002.
- Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. and Ziff, E.B.: c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo J* 13 (1994) 4070-9.
- Lieberman, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K. and Eckhardt, L.A.: An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 933-7.
- Linderson, Y., Cross, D., Neurath, M.F. and Pettersson, S.: NFE, a new transcriptional activator that facilitates p50 and c-Rel-dependent IgH 3' enhancer activity. *Eur J Immunol* 27 (1997) 468-75.
- Lindstrom, M.S. and Wiman, K.G.: Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 12 (2002) 381-7.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G. and Evan, G.I.: A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 1686-90.
- Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A. and Quesnel, B.: Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110 (2007) 296-304.
- Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y. and MacLennan, I.C.: Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21 (1991) 2951-62.
- Lo, A.K., Lo, K.W., Tsao, S.W., Wong, H.L., Hui, J.W., To, K.F., Hayward, D.S., Chui, Y.L., Lau, Y.L., Takada, K. and Huang, D.P.: Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia* 8 (2006) 173-80.

- Longnecker, R., Miller, C.L., Miao, X.Q., Tomkinson, B. and Kieff, E.: The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *J Virol* 67 (1993) 2006-13.
- Luo, Q., Li, J., Cenkci, B. and Kretzner, L.: Autorepression of c-myc requires both initiator and E2F-binding site elements and cooperation with the p107 gene product. *Oncogene* 23 (2004) 1088-97.
- MacLennan, I.C.: Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 117-39.
- Madisen, L. and Groudine, M.: Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev* 8 (1994) 2212-26.
- Madisen, L., Krumm, A., Hebbes, T.R. and Groudine, M.: The immunoglobulin heavy chain locus control region increases histone acetylation along linked c-myc genes. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 6281-92.
- Maheswaran, S., Lee, H. and Sonenshein, G.E.: Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 1147-52.
- Manis, J.P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A. and Alt, F.W.: Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* 188 (1998) 1421-31.
- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A. and Kieff, E.: The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65 (1991) 6826-37.
- Mao, D.Y., Watson, J.D., Yan, P.S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W.W., Farnham, P.J., Huang, T.H. and Penn, L.Z.: Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13 (2003) 882-6.
- Martensson, I.L., Keenan, R.A. and Licence, S.: The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 19 (2007) 137-42.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J. and Liu, Y.J.: Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183 (1996) 971-7.
- Mason, J.O., Williams, G.T. and Neuberger, M.S.: Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* 41 (1985) 479-87.
- Matsumoto, M., Mariathasan, S., Nahm, M.H., Baranyay, F., Peschon, J.J. and Chaplin, D.D.: Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 271 (1996) 1289-91.
- Matthias, P. and Baltimore, D.: The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 1547-53.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. and Cole, M.D.: The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94 (1998) 363-74.
- McMahon, S.B., Wood, M.A. and Cole, M.D.: The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 556-62.

- Meffre, E., Papavasiliou, F., Cohen, P., de Bouteiller, O., Bell, D., Karasuyama, H., Schiff, C., Banchereau, J., Liu, Y.J. and Nussenzweig, M.C.: Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med* 188 (1998) 765-72.
- Meyer, N., Kim, S.S. and Penn, L.Z.: The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 275-87.
- Meyer, N. and Penn, L.Z.: Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8 (2008) 976-90.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L. and Birshtein, B.K.: Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 975-81.
- Middeldorp, J.M. and Pegtel, D.M.: Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape. *Semin Cancer Biol* 18 (2008) 388-96.
- Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M. and Max, E.E.: Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J Exp Med* 186 (1997) 845-58.
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C. and El-Deiry, W.S.: Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res* 60 (2000) 6318-25.
- Mocikat, R., Harloff, C. and Kutemeier, G.: The effect of the rat immunoglobulin heavy-chain 3' enhancer is position dependent. *Gene* 136 (1993) 349-53.
- Mocikat, R., Kardinal, C. and Klobeck, H.G.: Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain mu intron and 3' enhancer. *Eur J Immunol* 25 (1995) 3195-8.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr. and Thomson, A.W.: Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104 (2004) 3257-66.
- Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A. and Cogne, M.: The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102 (2003) 1421-7.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E.: The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80 (1995) 389-99.
- Muhlbauer, M., Fleck, M., Schutz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Scholmerich, J. and Hellerbrand, C.: PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 45 (2006) 520-8.
- Munz, C. and Moormann, A.: Immune escape by Epstein-Barr virus associated malignancies. *Semin Cancer Biol* 18 (2008) 381-7.
- Murphy, M.J., Wilson, A. and Trumpp, A.: More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol* 15 (2005) 128-37.
- Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M. and Igarashi, K.: The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429 (2004) 566-71.
- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S. and Karasuyama, H.: The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7 (1997) 559-70.

- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorenec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphael, M., Feuillard, J. and Fagard, R.: Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 79 (2005) 4936-43.
- Neel, B.G., Hayward, W.S., Robinson, H.L., Fang, J. and Astrin, S.M.: Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23 (1981) 323-34.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M. and Lassila, O.: Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24 (2006) 283-93.
- Nesbit, C.E., Tersak, J.M. and Prochownik, E.V.: MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18 (1999) 3004-16.
- Neuberger, M.S. and Calabi, F.: Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* 305 (1983) 240-3.
- Neurath, M.F., Strober, W. and Wakatsuki, Y.: The murine Ig 3' alpha enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S alpha-BP). *J Immunol* 153 (1994) 730-42.
- Nieminen, A.I., Partanen, J.I. and Klefstrom, J.: c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc. *Cell Cycle* 6 (2007) 2464-72.
- Niirö, H. and Clark, E.A.: Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 945-56.
- Nishikura, K., ar-Rushdi, A., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G. and Croce, C.M.: Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 4822-6.
- Nishino, K., Osaki, T., Kumagai, T., Kijima, T., Tachibana, I., Goto, H., Arai, T., Kimura, H., Funakoshi, T., Takeda, Y., Tanio, Y. and Hayashi, S.: Adenovirus-mediated gene therapy specific for small cell lung cancer cells using a Myc-Max binding motif. *Int J Cancer* 91 (2001) 851-6.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. and Mendell, J.T.: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435 (2005) 839-43.
- O'Hagan, R.C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I.M., Alt, F.W., Kaelin, W.G., Jr. and DePinho, R.A.: Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* 14 (2000) 2185-91.
- Okazaki, I.M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K. and Honjo, T.: Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197 (2003) 1173-81.
- Okazaki, I.M., Kotani, A. and Honjo, T.: Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol* 94 (2007) 245-73.
- Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G. and Eckhardt, L.A.: 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J Immunol* 160 (1998) 4896-903.
- Oster, S.K., Ho, C.S., Soucie, E.L. and Penn, L.Z.: The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res* 84 (2002) 81-154.

- Pai, S. and Khanna, R.: Role of LMP1 in immune control of EBV infection. *Semin Cancer Biol* 11 (2001) 455-60.
- Pajic, A., Polack, A., Staeger, M.S., Spitkovsky, D., Baier, B., Bornkamm, G.W. and Laux, G.: Elevated expression of c-myc in lymphoblastoid cells does not support an Epstein-Barr virus latency III-to-I switch. *J Gen Virol* 82 (2001) 3051-5.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., Polack, A. and Eick, D.: Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87 (2000) 787-93.
- Palomo, C., Zou, X., Nicholson, I.C., Butzler, C. and Bruggemann, M.: B-cell tumorigenesis in mice carrying a yeast artificial chromosome-based immunoglobulin heavy/c-myc translocus is independent of the heavy chain intron enhancer (Emu). *Cancer Res* 59 (1999) 5625-8.
- Panagopoulos, D., Victoratos, P., Alexiou, M., Kollias, G. and Mosialos, G.: Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo. *J Virol* 78 (2004) 13253-61.
- Park, S.S., Kim, J.S., Tessarollo, L., Owens, J.D., Peng, L., Han, S.S., Tae Chung, S., Torrey, T.A., Cheung, W.C., Polakiewicz, R.D., McNeil, N., Ried, T., Mushinski, J.F., Morse, H.C., 3rd and Janz, S.: Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 65 (2005a) 1306-15.
- Park, S.S., Shaffer, A.L., Kim, J.S., duBois, W., Potter, M., Staudt, L.M. and Janz, S.: Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res* 65 (2005b) 7644-52.
- Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J. and Allday, M.J.: Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13 (1996) 2541-9.
- Parker, G.A., Touitou, R. and Allday, M.J.: Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19 (2000) 700-9.
- Parsa, A.T., Waldron, J.S., Panner, A., Crane, C.A., Parney, I.F., Barry, J.J., Cachola, K.E., Murray, J.C., Tihan, T., Jensen, M.C., Mischel, P.S., Stokoe, D. and Pieper, R.O.: Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 13 (2007) 84-8.
- Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J. and Granner, D.K.: Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 2650-4.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., 3rd, Nussenzweig, M.C. and Dalla-Favera, R.: AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40 (2008) 108-12.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K. and Dalla-Favera, R.: BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 11816-21.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412 (2001) 341-6.

- Patel, J.H., Loboda, A.P., Showe, M.K., Showe, L.C. and McMahon, S.B.: Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 562-8.
- Pawlik, C.A., Iyengar, R.V., Krull, E.J., Mason, S.E., Khanna, R., Harris, L.C., Potter, P.M., Danks, M.K. and Guichard, S.M.: Use of the ornithine decarboxylase promoter to achieve N-MYC-mediated overexpression of a rabbit carboxylesterase to sensitize neuroblastoma cells to CPT-11. *Mol Ther* 1 (2000) 457-63.
- Pelengaris, S., Khan, M. and Evan, G.: c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2 (2002a) 764-76.
- Pelengaris, S., Khan, M. and Evan, G.I.: Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109 (2002b) 321-34.
- Penn, L.J., Brooks, M.W., Laufer, E.M. and Land, H.: Negative autoregulation of c-myc transcription. *Embo J* 9 (1990a) 1113-21.
- Penn, L.J., Brooks, M.W., Laufer, E.M., Littlewood, T.D., Morgenstern, J.P., Evan, G.I., Lee, W.M. and Land, H.: Domains of human c-myc protein required for autosuppression and cooperation with ras oncogenes are overlapping. *Mol Cell Biol* 10 (1990b) 4961-6.
- Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D.M. and Allison, J.P.: Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 17765-70.
- Perez-Roger, I., Solomon, D.L., Sewing, A. and Land, H.: Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14 (1997) 2373-81.
- Perlot, T. and Alt, F.W.: Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv Immunol* 99 (2008) 1-32.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H. and Pinaud, E.: Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 14362-7.
- Peters, G.: Oncogenes at viral integration sites. *Cell Growth Differ* 1 (1990) 503-10.
- Petroff, M.G., Chen, L., Phillips, T.A. and Hunt, J.S.: B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal-fetal interface. *Placenta* 23 Suppl A (2002) S95-101.
- Petrovas, C., Casazza, J.P., Brenchley, J.M., Price, D.A., Gostick, E., Adams, W.C., Precopio, M.L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D.C. and Koup, R.A.: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203 (2006) 2281-92.
- Pettersson, S., Cook, G.P., Bruggemann, M., Williams, G.T. and Neuberger, M.S.: A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 344 (1990) 165-8.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T.: Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304 (2004) 734-6.
- Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L.M. and Wirth, T.: Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *Embo J* 13 (1994) 1654-63.
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P., Terry, N., Reid, P.S. and Ford, R.J.: A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity* 16 (2002) 37-50.

- Phan, R.T. and Dalla-Favera, R.: The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432 (2004) 635-9.
- Picard, D.: Posttranslational regulation of proteins by fusions to steroid-binding domains. *Methods Enzymol* 327 (2000) 385-401.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C. and Cogne, M.: Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur J Immunol* 27 (1997) 2981-5.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M. and Cogne, M.: Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15 (2001) 187-99.
- Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Beswick, E.J., Boya, G., Qiu, S.M., Mifflin, R.C., Raju, G.S., Reyes, V.E. and Powell, D.W.: PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology* 135 (2008) 1228-1237, 1237 e1-2.
- Podar, K., Tonon, G., Sattler, M., Tai, Y.T., Legouill, S., Yasui, H., Ishitsuka, K., Kumar, S., Kumar, R., Pandite, L.N., Hideshima, T., Chauhan, D. and Anderson, K.C.: The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 19478-83.
- Poirel, H.A., Bernheim, A., Schneider, A., Meddeb, M., Choquet, S., Leblond, V., Charlotte, F., Davi, F., Canioni, D., Macintyre, E., Mamzer-Bruneel, M.F., Hirsch, I., Hermine, O., Martin, A., Cornillet-Lefebvre, P., Patey, M., Toupance, O., Kemeny, J.L., Deteix, P. and Raphael, M.: Characteristic pattern of chromosomal imbalances in posttransplantation lymphoproliferative disorders: correlation with histopathological subcategories and EBV status. *Transplantation* 80 (2005) 176-84.
- Polack, A., Hortnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B.: c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 10411-6.
- Ponzielli, R., Katz, S., Baryshte-Lovejoy, D. and Penn, L.Z.: Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. *Eur J Cancer* 41 (2005) 2485-501.
- Prang, N., Wolf, H. and Schwarzmann, F.: Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J Virol* 69 (1995) 2644-8.
- Prang, N., Wolf, H. and Schwarzmann, F.: Latency of Epstein-Barr virus is stabilized by antisense-mediated control of the viral immediate-early gene BZLF-1. *J Med Virol* 59 (1999) 512-9.
- Prochownik, E.V. and Li, Y.: The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* 6 (2007) 1024-9.
- Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K. and Johnson, D.G.: ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 1446-51.
- Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T. and Allday, M.J.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol* 73 (1999) 5688-97.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C.: AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118 (2004) 431-8.

- Razzouk, B.I., Srinivas, S., Sample, C.E., Singh, V. and Sixbey, J.W.: Epstein-Barr Virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. *J Infect Dis* 173 (1996) 529-35.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. and Glimcher, L.H.: Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412 (2001) 300-7.
- Ricci, M.S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D.T. and El-Deiry, W.S.: Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 8541-55.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C.: AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135 (2008) 1028-38.
- Rochford, R., Cannon, M.J. and Moormann, A.M.: Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol* 3 (2005) 182-7.
- Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. and Roeder, R.G.: Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* 365 (1993) 359-61.
- Ruf, I.K., Rhyne, P.W., Yang, H., Borza, C.M., Hutt-Fletcher, L.M., Cleveland, J.L. and Sample, J.T.: Epstein-barr virus regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt lymphoma. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1651-60.
- Rustgi, A.K., Dyson, N. and Bernards, R.: Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352 (1991) 541-4.
- Ryan, K.M. and Birnie, G.D.: Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* 314 (Pt 3) (1996) 713-21.
- Sadhu, A., Shen, M.L., Hackbarth, M., Hume, E. and McKeithan, T.W.: CpG-rich sequences close to the site of duplication within the human IGH constant region. *Immunogenetics* 45 (1997) 365-70.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L. and Dalla-Favera, R.: A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12 (2007) 280-92.
- Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R. and Prendergast, G.C.: BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* 14 (1996) 69-77.
- Saleque, S., Singh, M. and Birshtein, B.K.: Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J Immunol* 162 (1999) 2791-803.
- Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S. and Birshtein, B.K.: Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol* 158 (1997) 4780-7.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 5463-7.
- Scheeren, F.A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Gimeno, R., Vyth-Dreese, F.A., Blom, B. and Spits, H.: STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol* 6 (2005) 303-13.

- Schlee, M., Holzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Eilers, M., Baran-Marszak, F., Fagard, R., Feuillard, J., Laux, G. and Bornkamm, G.W.: C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 120 (2007a) 1387-95.
- Schlee, M., Schuhmacher, M., Holzel, M., Laux, G. and Bornkamm, G.W.: c-MYC Impairs Immunogenicity of Human B Cells. *Adv Cancer Res* 97 (2007b) 167-88.
- Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B.C., Chen, L., Hartung, H.P., Weller, M. and Wiendl, H.: Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 155 (2004) 172-82.
- Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D. and Kohlhuber, F.: Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9 (1999) 1255-8.
- Sears, R.C.: The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3 (2004) 1133-7.
- Sen, R.: Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 25 (2006) 871-83.
- Sepulveda, M.A., Emelyanov, A.V. and Birshtein, B.K.: NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the human 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol* 172 (2004) 1054-64.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A. and Birshtein, B.K.: Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol Immunol* 42 (2005) 605-15.
- Serwe, M. and Sablitzky, F.: V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *Embo J* 12 (1993) 2321-7.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H. and Staudt, L.M.: XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21 (2004) 81-93.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P. and Staudt, L.M.: BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13 (2000) 199-212.
- Shapiro-Shelef, M. and Calame, K.: Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 230-42.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G. and Calame, K.: Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19 (2003) 607-20.
- Sharpe, A.H. and Freeman, G.J.: The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 116-26.
- Shi, Y., Glynn, J.M., Guilbert, L.J., Cotter, T.G., Bissonnette, R.P. and Green, D.R.: Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257 (1992) 212-4.
- Shin, T., Kennedy, G., Gorski, K., Tsuchiya, H., Koseki, H., Azuma, M., Yagita, H., Chen, L., Powell, J., Pardoll, D. and Housseau, F.: Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC

- costimulation of CD4⁺ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 198 (2003) 31-8.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G.V., Artandi, S., Goff, S.P. and Calame, K.: Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* 262 (1993) 1889-92.
- Singh, M. and Birshstein, B.K.: Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' alpha E(hs1,2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 4392-7.
- Spotts, G.D., Patel, S.V., Xiao, Q. and Hann, S.R.: Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 1459-68.
- Staege, M.S., Lee, S.P., Frisan, T., Mautner, J., Scholz, S., Pajic, A., Rickinson, A.B., Masucci, M.G., Polack, A. and Bornkamm, G.W.: MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 4550-5.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F. and Eilers, M.: Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3 (2001) 392-9.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E. and Schrader, C.E.: Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26 (2008) 261-92.
- Steffen, D.: Proviruses are adjacent to c-myc in some murine leukemia virus-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984) 2097-101.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. and Cory, S.: Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348 (1990) 331-3.
- Strome, S.E., Dong, H., Tamura, H., Voss, S.G., Flies, D.B., Tamada, K., Salomao, D., Cheville, J., Hirano, F., Lin, W., Kasperbauer, J.L., Ballman, K.V. and Chen, L.: B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63 (2003) 6501-5.
- Sugano, N., Chen, W., Roberts, M.L. and Cooper, N.R.: Epstein-Barr virus binding to CD21 activates the initial viral promoter via NF-kappaB induction. *J Exp Med* 186 (1997) 731-7.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. and Vardiman, J.W.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, WHO ed, 2008.
- Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G. and Wiman, K.G.: EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 5455-9.
- Takada, K. and Nanbo, A.: The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 11 (2001) 461-7.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P.: Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 7837-41.
- Taub, R., Moulding, C., Battey, J., Murphy, W., Vasicek, T., Lenoir, G.M. and Leder, P.: Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells. *Cell* 36 (1984) 339-48.

- Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N. and Azuma, T.: A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J Immunol* 167 (2001) 811-20.
- They, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S.: Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 569-79.
- Thompson, R.H., Webster, W.S., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Leibovich, B.C., Kuntz, S.M., Sengupta, S., Kwon, E.D. and Blute, M.L.: B7-H1 glycoprotein blockade: a novel strategy to enhance immunotherapy in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 66 (2005) 10-4.
- Thorley-Lawson, D.A.: EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 116 (2005) 251-61; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D.A. and Allday, M.J.: The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6 (2008) 913-24.
- Thorley-Lawson, D.A. and Gross, A.: Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350 (2004) 1328-37.
- Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67 (1993) 2014-25.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. and Tokuhisa, T.: Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17 (2002) 329-39.
- Trabattoni, D., Saresella, M., Biasin, M., Boasso, A., Piacentini, L., Ferrante, P., Dong, H., Maserati, R., Shearer, G.M., Chen, L. and Clerici, M.: B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood* 101 (2003) 2514-20.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., Routy, J.P., Haddad, E.K. and Sekaly, R.P.: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12 (2006) 1198-202.
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogne, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogne, M. and Denizot, Y.: The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol* 179 (2007) 6033-42.
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R. and Bishop, J.M.: c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* 414 (2001) 768-73.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. and Kikutani, H.: Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286 (1999) 300-3.
- Umetsu, D.T., Esserman, L., Donlon, T.A., DeKruyff, R.H. and Levy, R.: Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol* 144 (1990) 2550-7.
- Unniraman, S., Zhou, S. and Schatz, D.G.: Identification of an AID-independent pathway for chromosomal translocations between the Igh switch region and Myc. *Nat Immunol* 5 (2004) 1117-23.

- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G. and Ferrari, C.: PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80 (2006) 11398-403.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M.: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 (1988) 440-2.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. and Bishop, J.M.: Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42 (1982) 773-9.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogne, N., Cogne, M. and Denizot, Y.: Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol* 182 (2009) 6926-32.
- Vincent, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Petit, B., Cogne, N., Cogne, M. and Denizot, Y.: Uncoupling between Ig somatic hypermutation and oncogene mutation in mouse lymphoma. *Biochim Biophys Acta* 1793 (2009) 418-26.
- Vita, M. and Henriksson, M.: The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 318-30.
- Vousden, K.H.: Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer Cell* 2 (2002) 351-2.
- Walker, L.S., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T. and Lane, P.J.: Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40. *Immunol Today* 21 (2000) 333-7.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J.W., Chui, Y.L., Huang, D.P., Chen, Z.J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.C., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, Z.G. and Wu, Z.: Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 192-9.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64 (1990) 2309-18.
- Wang, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 3452-6.
- Wang, J. and Boxer, L.M.: Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem* 280 (2005) 12766-73.
- Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D. and Hannon, G.J.: Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12 (1998) 1769-74.
- Wang, L., Grossman, S.R. and Kieff, E.: Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 430-5.
- Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A. and Weinberg, R.A.: Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3 (2003) 219-31.

- Welcker, M. and Clurman, B.E.: FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 8 (2008) 83-93.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J.E., Harper, J.W., Eisenman, R.N. and Clurman, B.E.: The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 9085-90.
- Wierstra, I. and Alves, J.: The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv Cancer Res* 99 (2008) 113-333.
- Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R. and Trumpp, A.: c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18 (2004) 2747-63.
- Wu, R., Lin, L., Beer, D.G., Ellenson, L.H., Lamb, B.J., Rouillard, J.M., Kuick, R., Hanash, S., Schwartz, D.R., Fearon, E.R. and Cho, K.R.: Amplification and overexpression of the L-MYC proto-oncogene in ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 162 (2003) 1603-10.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E. and Kenter, A.L.: S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27 (2007) 711-22.
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T. and Uchiyama, T.: PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111 (2008) 3220-4.
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Tashima, M., Sakai, T., Ichinohe, T., Takaori-Kondo, A., Ohmori, K. and Uchiyama, T.: B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci* (2009).
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B.: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313 (1985) 812-5.
- Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R.: Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262 (1993) 747-50.
- Ye, M. and Graf, T.: Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 19 (2007) 123-8.
- Yindeeyoungyeon, W. and Schell, M.A.: Footprinting with an automated capillary DNA sequencer. *Biotechniques* 29 (2000) 1034-6, 1038, 1040-1.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B.: Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 757-68.
- Zaller, D.M. and Eckhardt, L.A.: Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 5088-92.
- Zelazowski, P., Shen, Y. and Snapper, C.M.: NF-kappaB/p50 and NF-kappaB/c-Rel differentially regulate the activity of the 3'alphaE-hsl,2 enhancer in normal murine B cells in an activation-dependent manner. *Int Immunol* 12 (2000) 1167-72.
- Zeller, K.I., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A. and Dang, C.V.: An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 4 (2003) R69.

- Zeller, K.I., Zhao, X., Lee, C.W., Chiu, K.P., Yao, F., Yustein, J.T., Ooi, H.S., Orlov, Y.L., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Kuznetsov, V.A., Sung, W.K., Ruan, Y., Dang, C.V. and Wei, C.L.: Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 17834-9.
- Zervos, A.S., Gyuris, J. and Brent, R.: Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72 (1993) 223-32.
- Zhang, J., Sattler, M., Tonon, G., Grabher, C., Lababidi, S., Zimmerhackl, A., Raab, M.S., Vallet, S., Zhou, Y., Cartron, M.A., Hideshima, T., Tai, Y.T., Chauhan, D., Anderson, K.C. and Podar, K.: Targeting angiogenesis via a c-Myc/hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent pathway in multiple myeloma. *Cancer Res* 69 (2009) 5082-90.
- Zimber-Strobl, U. and Strobl, L.J.: EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11 (2001) 423-34.

ANNEXE

Molecular Basis of Cytotoxicity of Epstein-Barr (EBV) Latent Membrane Protein 1 (LMP1) in EBV Latency III B Cells : LMP1 Induces Type II Ligand-Independent Autoactivation of CD95/Fas with Caspase 8-Mediated Apoptosis.

Le Corennec C., Ouk T-S., Youlyouz-Marfak I., Panteix S., MartinC-C., Rastelli J., Adriaenssens E., Zimmer-Strobl U., Coll J., Feuillard J., and Jayat-Vignoles C.

Journal of Virology. 2008 July; 82(13) : p. 6721-6733.

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02250-07>