

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

UMR CNRS 6101

Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations
Equipe « Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs »

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialités : Immunologie - Onco-hématologie

présentée et soutenue publiquement par

Rémi FIANCETTE

le 28 juin 2011

**Etude *in vivo* du rôle de la région régulatrice en 3'
du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline dans la
dérégulation d'oncogènes et l'émergence de
lymphomes**

Directeur de thèse : Dr. Yves DENIZOT

JURY

Président :

M. Michel COGNE

Professeur des Universités - Université de Limoges

Rapporteurs :

M. Cyril BROCCARDO

Chargé de Recherche INSERM, Toulouse

M. Pierre DUBUS

Professeur des Universités - Université Bordeaux 2

Examineurs :

M. Eric DELABESSE

Professeur des Universités - Université Toulouse III

M. Yves DENIZOT

Chargé de Recherche INSERM, Limoges

Résumé

Le développement des lymphocytes B est jalonné par des événements de recombinaisons et de mutations des gènes d'immunoglobuline, notamment dans le locus de chaîne lourde (locus *IgH*). Ces événements de remodelage de l'ADN le rendent particulièrement sensible aux translocations chromosomiques. Ainsi, un oncogène peut être déplacé dans le génome et intégré au sein du locus *IgH*, dont les activateurs transcriptionnels vont déréguler son expression, induire la transformation cellulaire et favoriser l'émergence d'un lymphome.

Des travaux précédents au laboratoire avaient validé l'utilisation d'un transgène « mini-locus » associant l'oncogène *c-myc* et la région régulatrice en 3' du locus *IgH* (3'RR) pour la modélisation du lymphome de Burkitt. Une partie de notre travail de thèse a consisté à créer, selon la même stratégie, des vecteurs associant d'autres oncogènes à la 3'RR afin de tenter de modéliser d'autres désordres lymphoprolifératifs. Par exemple, nous avons souhaité créer un modèle de lymphome du manteau, caractérisé le plus souvent par la translocation du gène de la cycline D1 dans le locus *IgH*. Toutefois, la cycline D1 sauvage n'est pas un oncogène fort et sa surexpression ne suffit pas à transformer la cellule et à induire le lymphome du manteau. Nous avons donc opté pour une stratégie alternative : nous avons étudié la coopération entre la surexpression de *c-myc* et l'expression d'une CDK4 mutée ($CDK4^{R24C}$) insensible à l'inhibition par les INK4 et donc constitutivement active. $CDK4^{R24C}$ est oncogénique mais ne prédispose pas aux lymphomes. En revanche, *c-myc* collabore avec elle dans la lymphomagenèse et nous a permis d'obtenir un modèle de lymphome du manteau.

Nous avons également diversifié le spectre de la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante en plaçant le transgène précédemment utilisé pour créer les modèles de lymphome de Burkitt dans un fond génétique déficient pour p53. La perte de la fonction suppressive de tumeur de p53 a créé un contexte permissif pour la croissance tumorale en compromettant des mécanismes de protection cellulaire s'opposant à la transformation. Ainsi, des mutations secondaires coopératives ont été plus facilement acquises et leur combinaison a généré différents types de tumeurs : des lymphomes de Burkitt $CD43^-$ et $CD43^+$, des lymphomes du manteau et des lymphomes plasmoblastiques. Ces données confirment que la 3'RR est le principal élément *cis*-activateur qui dérégule l'expression des oncogènes transloqués lors des lymphomes B matures.

Mots-clés : *IgH* 3'RR, immunoglobuline, lymphocyte B, lymphome, modèle murin, oncogène, translocation.

Abstract

B cell development is punctuated by recombination and mutation events of immunoglobulin genes, notably in the heavy chain locus (*IgH* locus). Such DNA remodelling events render *IgH* locus particularly sensitive to chromosomal translocations. As a result, an oncogene can be moved and inserted close to the *IgH* locus and consequently deregulated by *IgH* transcriptional enhancers, triggering cell transformation and promoting lymphoma development.

Previous works in our laboratory validated a transgenic “mini-locus” strategy linking *c-myc* oncogene and *IgH* locus 3' regulatory region (3'RR) to mimic Burkitt lymphoma chromosomal translocation. A part of my work aimed to create vectors linking other oncogenes and the 3'RR, according to the same strategy, in order to make mouse models for other lymphoid malignancies. For example, we tried to reproduce mantle cell lymphoma by mimicking the translocation of cyclin D1 gene into the *IgH* locus. Nevertheless, we found that wild type cyclin D1 overexpression is not by itself sufficient to induce cell transformation and the occurrence of mantle cell lymphoma. We then chose another approach: we studied cooperation between *c-myc* overexpression and the expression of a mutated CDK4 (CDK4^{R24C}), insensitive to inhibition by INK4 family and consequently constitutively active. CDK4^{R24C} is oncogenic but does not predispose to lymphomas. On the contrary, *c-myc* collaborated with it and gave rise to a mantle cell lymphoma mouse model.

We also widened the spectrum of *c-myc*-induced lymphomas by introducing the transgene previously used to create Burkitt lymphoma model into a p53-deficient genetic background. The loss of tumour suppressor function of p53 made a permissive background for tumour growth by impairing fail-safe mechanisms fighting against cell transformation. As a result, secondary cooperating mutations could occur more easily and their combination produced different lymphoma types: CD43⁻ and CD43⁺ Burkitt lymphomas, mantle cell lymphoma and plasmablastic lymphoma. These data confirm that the 3'RR is the main *cis*-acting element that deregulates translocated oncogenes expression in mature B cell lymphomas.

Key-words: B cell, *IgH* 3'RR, immunoglobulin, lymphoma, mouse model, oncogene, translocation.

Durant ces quatre années, nous avons été financé par une allocation de recherche accordée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



Laboratoire de Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations
UMR CNRS 6101
Equipe « Génétique moléculaire de la cellule B et des syndromes immunoprolifératifs »
Faculté de Médecine
2, rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES Cedex



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Michel COGNE, qui m'a accueilli dans son laboratoire dès mon stage de DEA, puis durant ma thèse. Je vous remercie d'avoir cru en moi lorsque, encore en maîtrise, je suis venu vous voir un soir, tout hésitant, une confiance en moi chancelante pour ne pas dire inexistante (en ai-je d'ailleurs vraiment acquis au cours de ces cinq dernières années?). Merci de m'avoir donné l'occasion de réaliser ma thèse en immunologie, une discipline qui me passionne, dans votre unité de recherche. Je vous remercie également d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

Je souhaite témoigner ma profonde gratitude au Docteur Yves DENIZOT, mon directeur de thèse (après avoir été mon maître de stage de DEA), pour la qualité de son encadrement tout au long de mon travail. Je te remercie pour ta présence et ta disponibilité sans faille durant ma thèse, y compris dans les moments de doute, pour ta patience, ton aide et tes précieux conseils, pour la confiance dont tu as fait preuve à mon égard (j'espère en avoir été digne et ne pas t'avoir déçu), pour toutes tes qualités et valeurs scientifiques dont tu m'as fait profiter. J'ai énormément appris à tes côtés. Très simplement, mais sincèrement, merci.

Je suis très reconnaissant envers les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Je remercie chaleureusement le Docteur Cyril BROCCARDO et le Professeur Pierre DUBUS d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire, ainsi que le Professeur Eric DELABESSE d'en être l'un des examinateurs. Merci de l'intérêt dont vous faites preuve à l'égard de mon travail. Soyez assurés de tout mon respect et de ma profonde reconnaissance.

Je voudrais également remercier tous les membres, passés et actuels, de l'UMR 6101 (dans un ordre qui ne reflète aucunement une quelconque préférence), qui ont permis, et permettent, un travail agréable dans la bonne humeur. Merci au petit groupe de la « *Denizot-team* » : Véronique, qui m'a mis le pied à l'étrier et m'a beaucoup aidé lors de mon DEA, Christelle, et la nouvelle venue, la relève, Pauline (Paulette, Pau-Pau, « fesses d'acier »...). Ce fut un réel plaisir de venir travailler quotidiennement dans une ambiance bon enfant, dans ce petit bureau.

Merci à Eric, toujours présent, pour sa disponibilité et son aide aussi bien techniques, scientifiques que linguistiques (j'espère que mon post-doc outre-Manche me permettra de combler mes profondes lacunes dans la langue de Shakespeare).

Merci aussi au « bureau Tempus » (je n'ai jamais su pourquoi il s'appelait ainsi) : Claire, pour sa bonne humeur quotidienne, sa gentillesse et ses multiples conseils, notamment en cytométrie, Christophe, Laurent, Catherine, Sébastien, ainsi que Zéliha, que j'ai connue en DEUG et qui m'a initié à la physiologie bactérienne.

Radaaaaaaaaaaaaaaaaaiiiiiiiiiee, merci pour tout, ta gentillesse, ta disponibilité, ton humour, nos crises de rires (sur des choses qui parfois ne faisaient rire que moi)... « *Je té la jurte!* » « *Aaahhh... c'est compliqué!* » « *Çaaa faaaaaarrrrte?!!* » « *N'est-ce pââââââs, oui?* »... Merci également à Virginie (Virginaaaïïïïiee) et Aurélie (Aurélaaaïïïïiee). Je vous souhaite à toutes les trois une bonne continuation et beaucoup de réussite dans la suite de votre vie professionnelle (et personnelle, mais ça, ça ne me regarde pas...). Merci aussi à Chahrazed, Christelle, Sandrine (ou Cendrine), Sophie P.. Une pensée également pour les « anciens » de l'équipe du 3^{ème} que j'ai

été amené à côtoyer et qui ont poursuivi leur chemin dans d'autres laboratoires : Anne-Gaelle, Karine, Sophie D., Virginie (V2).

Un petit mot pour Guillaume, dont j'ai fait la connaissance lors d'un certain cours de physiologie avec Fred Ramade, en licence (ça ne nous rajeunit pas tout ça...). Bon courage pour la fin de ta thèse. Tu seras le suivant. Je te souhaite le meilleur pour la suite, notamment de trouver un post-doc, là où tu le désires (aux Etats-Unis, me semble-t-il). J'espère ne pas perdre le contact malgré mon exil en Angleterre.

Merci et bon courage aux actuels et futurs doctorants de l'équipe : Amélie, Armand, Aurélien, Brice (un grand merci pour ton aide au cytomètre), Fabien, Marie.

Je remercie également toute l'équipe du 2^{ème} (statutaires, doctorants, post-doctorants et Master 2 confondus), sous l'égide de Jean Feuillard : Abdel, Amandine, Catherine, pour son expertise en tri cellulaire, Chantal, David, Estelle, Ibtissam, temporairement une « collègue de biologie végétale », Isabelle, Mona, Nadine, pour les nombreuses souris qu'elle a générées, Nathalie, Stéphanie. Merci aux « anciens », Christophe et Tan, pour leur sympathie.

Je remercie l'équipe de « *B-Cell-Design* » : Armelle, Cécile, Gaël, Jean Sainte-Laudy et Marie (« *Oh joliiiiiiiiiiiiiiiiiiii !* »).

Cher Christian, merci pour tout, d'une part pour les multiples commandes plus ou moins urgentes que tu as passées durant ma thèse, et d'autre part, d'un point de vue moins professionnel, pour tous les délires « de funèbres » et les innombrables conversations par répliques interposées, que seuls nous pouvions comprendre... Un petit florilège... « *Comment ça merde alors ? But alors you are French !* » « *Si cet insigne paraît rosette...* » « *Il est pas là l'patron ?* » « *Un petit Cachou Monsieur Septime ?* » « *Il parle ! Mon cheval parle ! il parle !* » « *C'est psychique... Il croît qu'il a mal, c'est psychique...* » « *Mon eau minérale ?...* » « *Vous, là-bas, on ne vous entend jamais !* » « *Yes my Lord. Yes my Lord.* » « *Tu veux un coup de pelle ?!* » etc. etc.. Je vais m'arrêter car on pourrait en écrire bien plus d'un volume. Ces quelques moments de détente vont me manquer à Cambridge. Merci aussi à Carine (« *Ça va ma p'tite Carine ?* »). Je tiens par ailleurs à remercier Mademoiselle Rongibut, qui nous a fait tant rire (je crois que seul Christian peut comprendre cette dédicace...).

Un immense merci aux anges gardiens des souris, Bernadette, Karine et Sylvie. Merci pour le travail énorme que vous accomplissez au quotidien, pour l'entretien et le soin de nos précieuses souris. Vous gérez tout cela avec énergie et brio, même si parfois (souvent, même...) on ne vous facilite pas la tâche. Nous vous devons beaucoup. Je vous suis infiniment reconnaissant.

Merci à Bernadette, Delphine puis Makiadi pour leur aide quotidienne.

Je voudrais aussi profiter de ces quelques pages pour exprimer toute ma gratitude au Professeur Michael NEUBERGER, au Docteur Cristina RADA, ainsi qu'au Docteur Alexander BETZ, pour leur accueil dans leurs groupes respectifs du Laboratoire de Biologie Moléculaire (MRC – LMB) à Cambridge, lorsque je démarchais les laboratoires à la recherche d'un post-doc. Je vous remercie infiniment de m'avoir reçu, merci de votre intérêt pour mon travail, de votre disponibilité et du temps que vous m'avez consacré. Soyez assurés de mon profond respect. Merci Dr. RADA et Prof. NEUBERGER de m'avoir donné l'occasion de présenter un séminaire devant votre équipe, dans un lieu aussi prestigieux, et non moins impressionnant. Merci Dr. BETZ de me donner l'opportunité de réaliser mon post-doc dans votre groupe et d'écrire un

nouveau chapitre de ma « vie scientifique ». J'espère être digne de la confiance que vous m'accordez, et ne pas vous décevoir. Je souhaite également remercier les personnes qui m'ont fait l'honneur de me recevoir dans deux laboratoires en France : le Docteur Thierry DEFRANCE et le Docteur Laurent GENESTIER à Lyon (U851 INSERM), le Docteur Julie DECHANET-MERVILLE et le Docteur Myriam CAPONE à Bordeaux (UMR CNRS 5164).

Je remercie le Docteur Pascal LABROUSSE pour son aide précieuse et ses nombreux conseils, aussi bien scientifiques qu' « extra-scientifiques », notamment à l'occasion du monitorat au cours duquel j'ai été amené à enseigner des disciplines qui ne m'étaient pas vraiment familières : la Botanique et la Physiologie végétale. Merci d'avoir essayé de me rassurer lorsque j'estimais que je « n'avais pas le niveau »... Je crois que ça n'a pas changé, et ma légendaire confiance en moi me pousse à penser que je ne l'ai toujours pas, ce fameux niveau, et pas seulement en biologie végétale !

Je remercie les médecin et techniciens du service d'Immunologie et d'Immunogénétique du CHU Dupuytren que j'ai côtoyés durant ma thèse : Ahmed, Delphine, François et Sonia, en « Immunologie cellulaire ».

Durant ma thèse, dans le cadre du monitorat, j'ai eu la chance de pouvoir rencontrer d'autres doctorants d'univers différents. Nos échanges furent un réel enrichissement. Bonne chance à tous les moniteurs de la promotion 2007-2010 pour la suite de leur carrière. Un grand merci également à Frédéric LOURADOUR, physicien, pour m'avoir fait connaître *Scientibus* et donné l'opportunité d'y être animateur pendant trois ans, et de rejoindre ainsi une équipe fort sympathique. C'est une expérience enrichissante et inoubliable. Merci de m'avoir accordé cette chance, ce privilège, même. Ce fut un vrai bonheur et un vrai plaisir d'aller à la rencontre du public et de voir l'enthousiasme suscité par la venue du bus. Je souhaite que le succès rencontré jusqu'à présent perdure.

Je remercie aussi mes amis, scientifiques ou non, pour les moments de détente, d'aucuns diront trop rares, pour leur présence et pour leur soutien. Merci de ne pas m'avoir oublié, malgré la distance, les emplois du temps chargés, le peu de temps disponible... et mon fichu caractère. Pardon d'avoir été (et d'être encore) souvent débordé et de n'avoir pas toujours pu être présent, merci sincèrement à vous en tout cas de l'avoir été. Je ne vous citerai pas, sans doute par pudeur et par discrétion, mais je pense bien à vous, et moi non plus je ne vous oublie pas.

Enfin, merci à mes parents, mon frère et plus généralement ma famille, pour m'avoir soutenu, encouragé et surtout supporté durant toutes ces années.

« Une fois qu'on est fait au travail, on ne peut plus vivre sans lui. D'ailleurs, c'est de là que dépend tout dans le monde ; avec de la science, on est heureux ; avec de la science, on s'élève au-dessus de tous les autres ».

Louis PASTEUR (1822-1895)

« Beau mot que celui de chercheur, et si préférable à celui de savant ! Il exprime la saine attitude de l'esprit devant la vérité : le manque plus que l'avoir, le désir plus que la possession, l'appétit plus que la satiété. »

Jean ROSTAND (1894-1977)
Inquiétudes d'un biologiste

In memoriam

C'est avec une profonde affliction que nous avons appris, à la fin du mois de juin 2011, le décès du Pr. Fred RAMADE, professeur de physiologie animale à la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges, dans sa 66^{ème} année. Excellent pédagogue, il nous a enseigné avec passion la physiologie dès la première année du DEUG. Il a su nous transmettre son engouement pour cette discipline et nos échanges avec lui ont toujours été d'une infinie richesse. Il a grandement contribué à notre intérêt sans faille pour la physiologie, depuis nos premières années universitaires. Il a énormément compté pour nous. Ses cours resteront un souvenir mémorable, emprunt aujourd'hui de beaucoup d'émotion. Ce travail, bien qu'étant éloigné de sa spécialité scientifique (il était qualifié dans la section neurosciences), lui est dédié, en signe d'hommage et de reconnaissance pour tout ce qu'il a apporté à la construction de notre savoir scientifique.

*« Vous respirez la physiologie.
La physiologie, c'est votre oxygène ! »*

Liste des abréviations

+ : expression
- : absence d'expression

3'RR : région régulatrice 3' (*3' regulatory region*)
3C : capture de conformation chromosomique

Ψ : pseudogène

A : adénine/adénosine

A-NHEJ : voie alternative de **NHEJ**

ABC : cellule B activée *in vitro* (in vitro *activated B cell*)

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : **ADN** complémentaire

AICDA : cytidine déaminase induite après activation (*activation-induced cytidine deaminase*) (autre acronyme, souvent utilisé pour désigner le gène)

AID : cytidine déaminase induite après activation (*activation-induced cytidine deaminase*)

AIDS : SIDA (acronyme anglais pour *acquired immunodeficiency syndrome*)

AP-1 : protéine activatrice 1 (*activator protein 1*)

APE : endonucléases apuriques-apyrimidiques

API2 : *apoptosis inhibitor 2*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : **ARN** messenger

ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

ATR : *ataxia-telangiectasia and Rad3-related*

Bcl- : *B-cell lymphoma-*

BCR : récepteur de cellules B (*B cell receptor*), ou *breakpoint cluster region*, dans le cas du gène du chromosome 9 impliqué dans la translocation Philadelphie

Blimp-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein*

C : cytidine/cytosine, se rapportant aux acides nucléiques, ou cystéine, se rapportant aux protéines

C-NHEJ : voie classique de **NHEJ**

CARM1 : *coactivator-associated arginine [R] methyltransferase 1*

CBP : *CREB (cAMP response element)-binding protein*

CCND1 : *cycline D1*

CD : *cluster of differentiation*

CDC : contrôle de la division cellulaire

CDK : kinase dépendant de cycline (*cyclin-dependent kinase*)

CDR : région déterminant la complémentarité (*complementarity determining region*)

CDT1 : *chromatin licensing and DNA replication factor 1*

cEμ : cœur d'**Eμ** (*core Eμ*)

CG : centre germinatif

CHK : kinase de point de contrôle (*checkpoint kinase*)

CKI : inhibiteur de CDK (*CDK inhibitor protein*)

CLL : acronyme anglo-saxon pour leucémie lymphoïde chronique (*chronic lymphocytic leukaemia*)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CREB : *(cAMP response element)-binding protein*

CTCF : facteur de liaison à CCCTC (*CCCTC-binding factor*)

d : dé(s)oxy-

D : segment de diversité

Da : dalton

dim : expression diminuée

DNA-PKcs : sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante

DNase : désoxyribonucléase

DNMT3a : ADN (cytosine-5)-méthyltransférase (*DNA [cytosine-5]-methyltransferase 3A*)

EBV : virus d'Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

Eμ : activateur intronique de chaîne lourde

EXO1 : exonucléase 1

FACT : facilitateur de la transcription de la chromatine (*facilitates chromatin transcription*)

FGFR3 : *fibroblast growth factor receptor 3*

FOXP1 : *forkhead box P1*

Frap : *FKBP12 rapamycin-associated protein, mTOR, RAFT*

G : guanine/guanosine

GC : centre germinatif (*germinal center*)

GSK3β : glycogène synthase kinase 3-β

H : chaîne lourde (*heavy chain*)

HAT : histone acétyl-transférase

HBH-LZ : hélice-boucle-hélice-leucine zipper

HDAC : histone déacétylase

HDM : *human double minute*

HHV : virus herpès humain (*human herpes virus*)

high : forte expression

hs : site d'hypersensibilité à la DNase (*DNase hypersensitivity site*)

hTERT : sous-unité transcriptase inverse de la télomérase humaine (*human telomerase reverse transcriptase*)

I : promoteur germinatif de gène constant

IE : gène à réponse précoce immédiate (*immediate early*)

Ig : immunoglobuline

IgH : chaîne lourde d'immunoglobuline

IgL : chaîne légère d'immunoglobuline

IKB : inhibiteur de NF-κB

INK : inhibiteur de CDK

J : segment de jonction

kb : kilobase

kDa : kilodalton

L : chaîne légère (*light chain*)

LDGCB : lymphome diffus à grandes cellules B

Lig4 : ADN ligase 4

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMP2A : protéine membranaire de latence 2A (*latent membrane protein 2A*)

low : faible expression

maf : *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (oncogène)

MALT : tissu lymphoïde associé aux muqueuses (*mucosa associated lymphoid tissue*)

MAR : région d'attachement à la matrice (*matrix attachment region*)

Max : *myc-associated protein X*

MB : boîte d'homologie myc (*myc homology box*)

MDM : *murine double minute*

Miz-1 : *myc-interacting zinc finger 1*

MRN : *Mre11-Rad50-Nbs1*

myc : *myelocytomatosis* (oncogène)

neo^R : gène de résistance à la néomycine (*neomycin resistance gene*)

NF-κB : facteur nucléaire κ B (*nuclear factor κ B*)

NFY : *nuclear factor Y*

NHEJ : jonction des extrémités non homologues (*non homologous end joining*)

p : phospho-, ou s'appliquant à un chromosome, désigne le bras court

p53C : domaine de cœur de p53 (domaine de liaison à l'ADN)

PAX5 : *paired box gene 5*

pb : paire de bases

pCAF : facteur associé à p300/CBP (*p300/CBP-associated factor*)

pgk : promoteur de la phosphoglycérate kinase

pRb : protéine du rétinoblastome

Pré-BCR : récepteur de cellule pré-B (*pre-B cell receptor*)

PRMT1 : *protein arginine [R] N-methyltransferase 1*

pVH : promoteur de région variable

q : bras long de chromosome

R : purine (A ou G), se rapportant aux acides nucléiques, ou arginine, se rapportant aux protéines

RAG : gène activant la recombinaison (*recombination activating gene*)

ras : *rat sarcoma* (oncogène)

Région S : région de commutation (*switch region*)

rel : *reticuloendotheliosis* (oncogène)

SCF : *Skp, Cullin, E-box containing complex*

Skp2 : *S-phase kinase-associated protein 2*

SLN : séquence de localisation nucléaire

SOCS1 : *suppressor of cytokine signalling 1*

Sp1 : *specificity protein 1*

SSR : séquence signal de recombinaison

SWI-SNF : *switch/sucrose non fermentable*

T : thymine/thymidine

TAD : domaine d'activation transcriptionnelle (*transcription activating domain*)

TdT : désoxynucléotidyltransférase terminale (*terminal deoxynucleotidyl-transferase*)

TFII-I : *transcriptional factor II-I*

TGF-β : facteur de croissance transformant-bêta (*transforming growth factor-beta*)

TRRAP : *transactivation/transformation-associated protein*

U : uracile/uridine

UNG : *uracil-DNA-glycosylase*

V : segment de variabilité

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*)

W : base azotée à faible liaison (deux liaisons hydrogène, A ou T)

XLFI : *XRCC4-like factor*

XRCC4 : *X-ray repair cross-complementing protein 4*

Y : pyrimidine (C ou T)

YY1 : *yin-yang 1*

Liste des figures

Figure 1. Structure des immunoglobulines.	4
Figure 2. Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobuline chez la souris.	5
Figure 3. Schéma simplifié des principales étapes du développement B précoce.	9
Figure 4. Les étapes du développement des lymphocytes B conventionnels.	11
Figure 5. Réarrangement des gènes de région variable de chaîne lourde d'immunoglobuline et règle 12/23.	14
Figure 6. Mécanismes des recombinaisons VDJ. Résolution des coupures double brin induites par les RAG.	15
Figure 7. Modèle de déamination de l'ADN pour la diversification des gènes d'immunoglobuline. .	17
Figure 8. Diagramme représentant la commutation de classe vers IgA (chez la souris).	18
Figure 9. Les mécanismes moléculaires responsables du remodelage des gènes de chaîne lourde d'immunoglobuline, et les trois points critiques de cassure et de translocation au locus <i>IgH</i>	22
Figure 10. L'origine cellulaire des lymphomes B.	26
Figure 11. Une mauvaise réparation des cassures d'ADN provoque des translocations.	29
Figure 12. La réparation des cassures d'ADN double brin.	35
Figure 13. Cartographie du locus <i>IgH</i> chez la souris (A) et chez l'homme (B) (pas à l'échelle).	43
Figure 14. Représentation schématique des différentes phases du cycle cellulaire.	101
Figure 15. Les principaux complexes cycline-CDK impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire chez l'homme.	102
Figure 16. Les inhibiteurs des CDK (CKI).	105
Figure 17. Les complexes entre les protéines de la famille du rétinoblastome et les facteurs E2F au niveau des promoteurs cibles d'E2F.	107
Figure 18. Le franchissement du point de restriction (R) et l'entrée en phase S.	108
Figure 19. Le contrôle mitogénique de l'activité des CDK de la phase G1.	109
Figure 20. La structure du gène <i>c-myc</i> (A) et les différentes régions de la protéine humaine (B).	111
Figure 21. Activation transcriptionnelle par le complexe c-myc-max et ses partenaires coopératifs. D'après Adhikary et Eilers, 2005 ; Cowling et Cole, 2006 ; Klapproth et Wirth, 2010.	113
Figure 22. Répression transcriptionnelle par le complexe c-myc-max.	114
Figure 23. Les phénomènes et mécanismes cellulaires contrôlés par c-myc en conditions physiologiques normales (gauche) et au cours de la tumorigenèse (droite).	118
Figure 24. Les différents domaines structuraux de la protéine p53.	122
Figure 25. Les sites de modifications post-traductionnelles de p53.	124
Figure 26. Le modèle actualisé de l'activation de p53.	126
Figure 27. Les mécanismes d'activation de p53 et les réponses générées.	129

Figure 28. Interactions de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2 et leur effet dans la mise en place du programme apoptotique. 133

Figure 29. Action et régulation de la cycline D1 dans les cellules normales (A) et cancéreuses (B). 159

Liste des tableaux

Tableau 1. Les lymphomes B humains matures. 23

Tableau 2. Les mécanismes de la lymphomagenèse des cellules B. 24

Tableau 3. Translocations chromosomiques dérégulant l'expression de *c-myc* dans trois espèces de mammifères (homme, souris, rat). D'après Janz, 2006. 120

Sommaire

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
Préambule	3
La lymphopoïèse B	7
1. UN APERÇU DE LA LYMPHOPOÏÈSE B	7
1.1. Phase précoce de la lymphopoïèse : la naissance de la lignée B... ..	7
1.2. Phase tardive de la lymphopoïèse : à la recherche de l'antigène... ..	9
2. LES EVENEMENTS GENIQUES DE LA LYMPHOPOÏÈSE B	13
2.1. Les recombinaisons V(D)J	13
2.2. L'hypermutation somatique	15
2.3. La commutation de classe.....	17
3. ESSENTIELLE ET BENEFIQUE, MAIS... ..	19
La lymphomagenèse	21
1. LES DANGERS DE LA LYMPHOPOÏÈSE.....	21
2. LES CARACTERISTIQUES DES CELLULES MALIGNES	25
2.1. L'origine cellulaire des lymphomes B	25
2.2. Les lésions oncogéniques lors des lymphomes	26
2.3. Le rôle du BCR	27
2.4. L'activation antigénique des lymphomes B.....	28
2.5. Le rôle du microenvironnement tumoral	28
3. L'ORIGINE ET LES MECANISMES DES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES	28
3.1. Le rôle des recombinaisons et des facteurs de réparation.....	29
3.2. Le rôle d'AID	32
3.3. L'action combinée des RAG et d'AID.....	33
3.4. L'implication des mécanismes de réparation	34
3.5. Les autres causes de cassures dans les loci des oncogènes	37
3.6. L'importance de la localisation subnucléaire	37
3.7. L'hypermutation des gènes « non-immunoglobulines ».....	38
Les mutations somatiques du gène <i>c-myc</i> transloqué lors des lymphomes	39
Les éléments régulateurs du locus <i>IgH</i>.....	43
1. LA REGION 5'.....	44
2. LA REGION INTERGENIQUE V _H -D	44
3. LE PROMOTEUR-ACTIVATEUR DQ52.....	45
4. L'ACTIVATEUR INTRONIQUE E _μ	45
5. LA REGION REGULATRICE 3' : 3'RR.....	46
The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis.....	49
The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind.....	60
La prolifération, la transformation et la réponse au stress.....	101
1. LE CYCLE CELLULAIRE ET L'INDUCTION DE LA PROLIFERATION	101
1.1. Les événements du cycle cellulaire.....	101
1.2. Le système de contrôle du cycle cellulaire.....	102
1.2.1. Description et présentation	102
1.2.2. Les kinases dépendant des cyclines (CDK)	102
1.2.3. Les cyclines	103
A propos de la cycline D1... ..	103
1.2.4. Les inhibiteurs des CDK	104
1.3. La prolifération cellulaire	105
1.3.1. Activation de l'expression génique au point de restriction	105
1.3.2. Régulation des complexes E2F-pRb	106
1.3.3. Activation des CDK de la phase G1 par les mitogènes	108
1.3.4. Autres fonctions de la cycline D1 et de CDK4 sur le cycle cellulaire.....	109

2.	L'ONCOGENE <i>c-MYC</i>	110
2.1.	La structure du gène et de la protéine	110
2.1.1.	Le gène <i>c-myc</i>	110
2.1.2.	La protéine <i>c-myc</i>	110
2.1.3.	Régulation de l'expression et de l'activité de <i>c-myc</i>	111
2.2.	L'activité de <i>c-myc</i>	112
2.2.1.	L'activation transcriptionnelle	112
2.2.2.	La répression transcriptionnelle	113
2.2.3.	Hormis la transcription ?... <i>c-myc</i> , réplication et traduction.....	114
2.3.	Les fonctions de <i>c-myc</i>	114
2.3.1.	Le cycle cellulaire, la prolifération et la croissance	115
2.3.2.	La différenciation et la pluripotentialité.....	115
2.3.3.	L'instabilité génomique	116
2.3.4.	L'adhésion cellulaire et l'angiogenèse	116
2.3.5.	L'apoptose.....	117
2.3.6.	La sénescence... et l'immortalité.....	117
2.4.	Le rôle de <i>c-myc</i> dans l'oncogenèse et la lymphopathogenèse	118
2.4.1.	La transformation cellulaire par <i>c-myc</i>	119
2.4.2.	La translocation de <i>c-myc</i> dans le locus <i>IgH</i> et sa dérégulation	119
3.	p53.....	121
3.1.	Le gène et la protéine	121
3.2.	Le contrôle de la transcription par p53	122
3.2.1.	Les mécanismes de la transcription régulée par p53.....	122
3.2.2.	Régulation de p53 et modulation de l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à p53.....	123
3.3.	Activation de p53 (principes généraux)	125
3.4.	Les fonctions suppressives de tumeur de p53	127
3.4.1.	Activation de la réponse p53 dans la suppression de tumeur	127
3.4.2.	L'arrêt du cycle cellulaire	130
3.4.3.	La sénescence cellulaire	130
3.4.4.	L'apoptose.....	131
3.4.5.	Comment la réponse p53 est-elle orientée ? Décision du destin de la cellule... ..	133
3.5.	p53 et le lymphocyte B	134

PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS 137

RÉSULTATS..... 141

Article 1 145

Article 2 147

Manuscrit 3 151

Manuscrit 4 153

DISCUSSION PERSPECTIVES..... 155

La seule surexpression de la cycline D1 sauvage ne suffit pas à promouvoir la lymphomagenèse..... 157

La cycline D1 constitutivement nucléaire est oncogénique 158

Le fond génétique BALB/c est résistant à la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante et ne prédispose pas au lymphome du manteau 161

Une CDK4 constitutivement active est capable de coopérer avec *c-myc* dans la lymphomagenèse 162

La défaillance de p53 confirme le rôle oncogénique de *c-myc* et révèle la diversité de son implication dans la lymphomagenèse..... 163

ANNEXES	165
<i>Annexe 1</i>	171
<i>Annexe 2</i>	173

Contexte bibliographique

Préambule

Système immunitaire et lymphocytes B

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme. Sa mission : reconnaître et éliminer les antigènes et les organismes envahisseurs étrangers (virus, bactéries, champignons, protozoaires...). Constamment en alerte, il veille à la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions qui pourraient compromettre son intégrité et son bon fonctionnement. Ces menaces peuvent provenir de pathogènes, mais aussi de dysfonctionnements cellulaires internes favorisant l'émergence de tumeurs. Il a à sa disposition un arsenal complexe constitué d'organes, de tissus, de cellules et de molécules spécialisées, et s'articule autour de deux mécanismes généraux : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée assure une résistance naturelle, impliquant notamment le système du complément, les macrophages et les cellules tueuses naturelles, qui agissent de façon non spécifique. L'immunité adaptative, au contraire, repose sur la compétence des lymphocytes de répondre spécifiquement et sélectivement à une stimulation par différents antigènes. Dans ce contexte, la réponse immunitaire à médiation humorale repose sur la sécrétion de molécules effectrices : les anticorps, ou immunoglobulines, par les cellules de la lignée B. Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un antigène en vue de le neutraliser et de l'éliminer. Les cellules B sont donc des constituants majeurs de l'immunité adaptative (pour revues : Honjo, Alt et Neuberger, 2004 ; Ollila et Vihinen, 2005).

Les immunoglobulines sont des hétérotétramères d'environ 150 kDa, exprimés à la surface des cellules B sous forme de récepteur membranaire ou excrétés par les plasmocytes (pour revue, Schroeder et Cavacini, 2010) (**Figure 1**). Elles sont formées de deux chaînes lourdes (H) identiques et de deux chaînes légères (L) identiques. Les chaînes lourdes sont unies par un ou plusieurs ponts disulfure. Les chaînes légères sont attachées aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité C-terminale. Chaque chaîne comprend une région constante (C) et une région variable (V). La combinaison des domaines variables des chaînes lourde et légère définit le site de reconnaissance et de liaison de l'antigène. Il est créé par une série complexe d'événements de réarrangements de segments de gènes. Il peut être ensuite soumis à un processus d'hypermutation somatique pour affiner la spécificité de l'immunoglobuline. Les domaines constants des chaînes lourdes confèrent à l'immunoglobuline ses propriétés effectrices et définissent sa classe, ou isotype : μ (qui définit l'IgM), δ (IgD), γ (IgG), ϵ (IgE) et α (IgA). En réponse à un antigène, l'isotype peut être commuté pour

Contexte bibliographique

modifier les fonctions effectrices de l'immunoglobuline tout en conservant la même spécificité antigénique. Les chaînes légères peuvent être de deux types : κ ou λ (Schroeder et Cavacini, 2010).

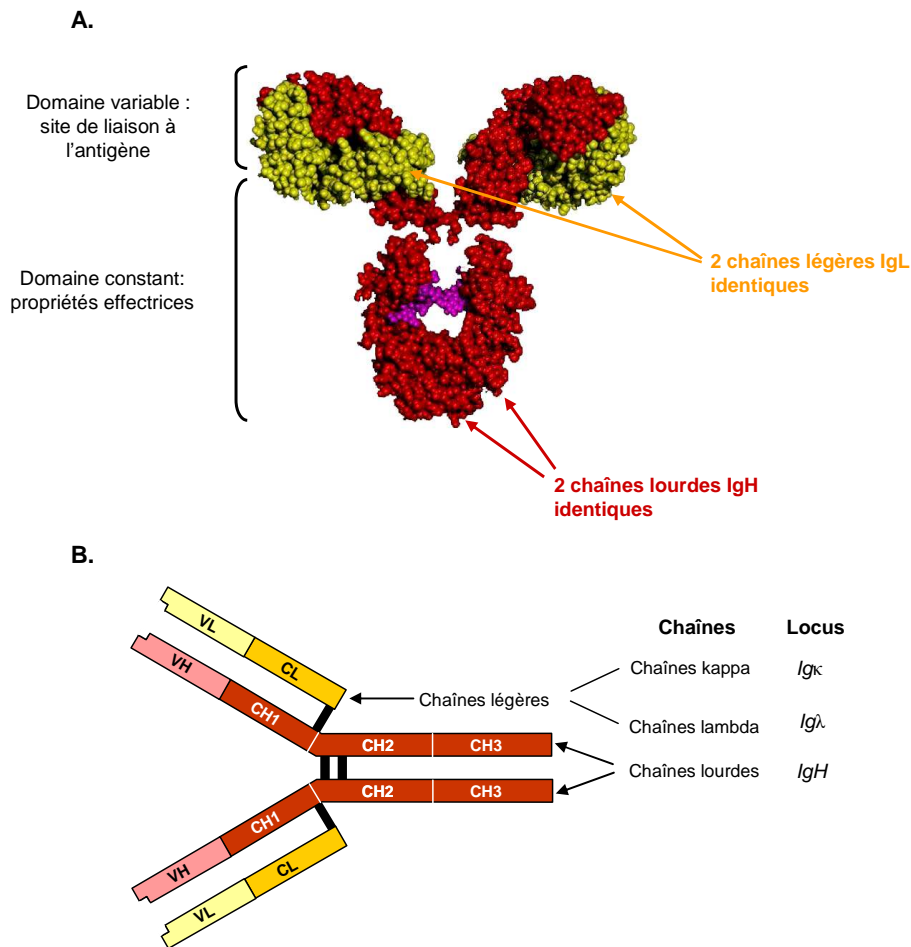


Figure 1. Structure des immunoglobulines.

A. Structure tridimensionnelle d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en rouge, les chaînes légères en jaune. Les glycosylations sont signifiées en violet. B. Structure bidimensionnelle. VH et VL : régions variables des chaînes lourdes et légères. CH et CL : régions constantes des chaînes lourdes et légères. Les traits noirs épais représentent les ponts disulfure.

Les gènes codant les immunoglobulines sont répartis en trois complexes différents : les loci *Igκ* (chromosome 6 chez la souris, 2 chez l'homme) et *Igλ* (chromosome 16 chez la souris, 22 chez l'homme) qui codent les chaînes légères et le locus *IgH* (chromosome 12 chez la souris, 14 chez l'homme) qui code les chaînes lourdes. La singularité des lymphocytes est la structure morcelée des gènes codant leurs récepteurs, qui correspond à leur configuration germinale (**Figure 2**). La région variable des immunoglobulines est codée par plus d'un segment de gène : un segment de variabilité (V_L) et un segment de jonction (J_L) pour la chaîne légère, un segment V_H , un segment de diversité (D) et un segment J_H pour la chaîne lourde. Lors du développement de la cellule B, ces segments doivent être réarrangés pour former des exons $V_L J_L$ et $V_H D J_H$ fonctionnels (pour revues : Lefranc et Lefranc, 2004 ; Matsuda, 2004 ; Riblet, 2004 ; Zachau, 2004).

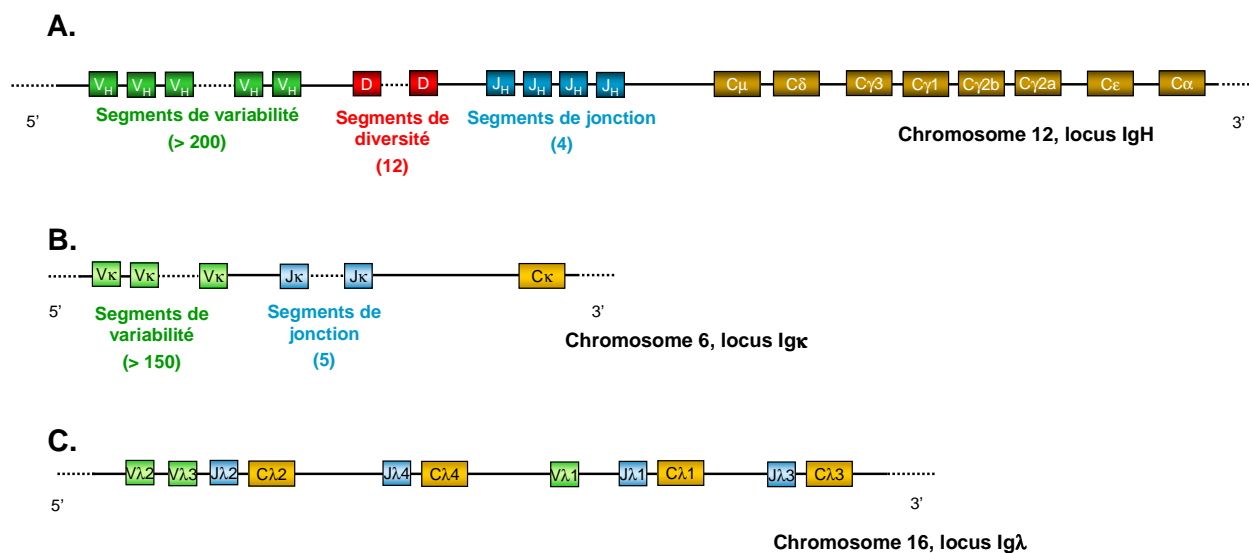


Figure 2. Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobuline chez la souris.
 A. Locus *IgH* sur le chromosome 12. Les gènes de chaîne lourde rassemblent plus de 200 segments V_H, une douzaine de segments D et 4 segments J_H. Viennent ensuite 8 segments C_H codant chacun un isotype différent. B. Locus *Igκ* sur le chromosome 6. Il comprend plus de 150 segments V_κ et 5 J_κ. Un seul segment C_κ code la partie constante de la chaîne κ. C. Locus *Igλ* sur le chromosome 16. Il est organisé en 4 paires de segment Jλ-Cλ, et ne contient que 3 segments Vλ. Le segment Vλ1 se combine préférentiellement à Jλ3 et Jλ1, et les segments Vλ2 et Vλ3 à Jλ2, les segments Jλ4 et Cλ4 sont défectifs. Les loci de chaîne légère ne possèdent pas de segment de diversité.

La maturation des cellules B repose sur une succession d'événements de remaniements géniques. Leur régulation est assurée par un programme complexe d'activation génique contrôlant la transcription et l'accessibilité des gènes, et impliquant plusieurs éléments *cis*-régulateurs agissant de façon synergique. Du fait de l'instabilité génomique inhérente au locus *IgH*, celui-ci est une zone critique de translocations chromosomiques. Les oncogènes transloqués sont juxtaposés aux puissants activateurs transcriptionnels du locus qui dérèglent leur expression, et favorisent le développement de lymphomes.

La lymphopoïèse B

La naissance des cellules B et la création du répertoire antigénique

1. UN APERÇU DE LA LYMPHOPOÏÈSE B

Le développement des lymphocytes B chez les mammifères implique une succession de stades de différenciation qui commencent dans les tissus lymphoïdes centraux, ou primaires (foie fœtal et moelle osseuse), indépendamment de la rencontre avec l'antigène étranger. La maturation se poursuit dans les tissus lymphoïdes périphériques, ou secondaires (rate, ganglions lymphatiques), après la rencontre avec l'antigène étranger. Le stade ultime du développement B est la production d'anticorps, ou immunoglobulines, par les plasmocytes. Les sous-populations à chaque stade de différenciation peuvent être identifiées à partir (1) de l'expression de diverses molécules de surface et de facteurs de transcription intracellulaires, (2) de l'état de réarrangement des gènes de chaînes lourde et légère d'immunoglobuline et (3) de l'expression du complexe du récepteur (pré-BCR, puis BCR) (pour revues : Kurosaki, 2010 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Meffre et *al.*, 2000 ; Monson, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010). Les voies de différenciation de la lignée B sont semblables chez l'homme (LeBien, 2000) et la souris (Hardy et *al.*, 2007).

1.1. Phase précoce de la lymphopoïèse : la naissance de la lignée B...

Les cellules souches hématopoïétiques sont hébergées dans la moelle osseuse, au sein d'un réseau complexe et dense de sinus vasculaires qui constitue la « niche de cellules-souches » (Schofield, 1978). Après plusieurs étapes de différenciation, elles donnent naissance au progéniteur lymphoïde commun, qui s'engagera dans la lignée B. Le précurseur B le plus précoce est la cellule pré-pro-B, d'après la nomenclature de Rolink/Melchers (Osmond et *al.*, 1998), qui correspond aux fractions A_{1,2} de Hardy (Hardy et *al.*, 1991)¹. Il commence à exprimer le marqueur spécifique de lignée CD45R (aussi appelé B220 chez la souris), mais n'exprime pas encore CD19. Les gènes d'immunoglobuline sont en configuration germinale. Le développement B précoce se caractérise par le réarrangement ordonné des loci de chaîne lourde (paragraphe 2.1), puis de chaîne légère,

¹ Les différents stades de différenciation des lymphocytes B ont été décrits selon plusieurs définitions phénotypiques, sans qu'une terminologie universelle n'ait été reconnue. Deux systèmes de nomenclature sont utilisés : la nomenclature de Philadelphie, qui repose sur les fractions définies par Hardy (Hardy et *al.*, 1991 ; Hardy et Hayakawa, 2001 ; Li et *al.*, 1996), et la nomenclature de Bâle, ou classification de Rolink/Melchers (Osmond et *al.*, 1998).

Contexte bibliographique

d'immunoglobuline, et les protéines ainsi codées jouent un rôle important dans la régulation de la lymphopoïèse B. La cellule pré-pro-B se différencie en cellule pro-B B220⁺ CD43⁺ CD24⁺ CD19⁺, précoce (fraction B de Hardy) puis tardive (fraction C). Elle exprime fortement les RAG et commence les réarrangements D-J_H sur les deux allèles (voir le paragraphe 2.1 de ce chapitre), mais n'exprime pas de chaîne lourde. La cellule pro-B tardive effectue le réarrangement V_H-DJ_H sur un allèle et se différencie en grande (fraction C'), puis petite (fraction D), cellule pré-B (**Figure 3**). Le réarrangement V_H-DJ_H ne peut être productif et fonctionnel que sur un seul allèle dans la cellule : c'est le phénomène de l'exclusion allélique (Corcoran, 2005 ; Jung et *al.*, 2006 ; Mostoslavsky et *al.*, 2004, Vettermann et Schlissel, 2010), qui assure la monospécificité des cellules B (Raff et *al.*, 1973 ; Vettermann et Schlissel, 2010).

La cellule pré-B exprime une chaîne lourde μ fonctionnelle, qui s'associe avec une chaîne légère de substitution (formée de deux chaînes : $\lambda 5$ et V-préB) et l'hétérodimère Ig α /Ig β pour constituer le récepteur de la cellule pré-B, ou pré-BCR (*pre-B cell receptor*) (Karasuyama et *al.*, 1996). L'expression du pré-BCR est un point de contrôle crucial de la maturation B : sa signalisation induit la survie et la différenciation des cellules pré-B, tandis que les cellules dépourvues de pré-BCR sont éliminées ou bloquées au stade pro-B (Herzog et *al.*, 2009 ; Mårtensson et *al.*, 2002). Les grandes cellules pré-B subissent ensuite une expansion clonale, au cours de laquelle l'expression des RAG est inhibée : ainsi, le pré-BCR assure l'exclusion allélique au locus *IgH* (*cf. supra*) en empêchant les réarrangements V_H-DJ_H sur le second allèle *IgH*. À l'issue de l'expansion clonale, les cellules deviennent de petites cellules pré-B. Le pré-BCR stimule également, ensuite, le réarrangement aux loci de chaînes légères (**Figure 3**) : il ré-induit l'expression de la machinerie de recombinaison (Herzog et *al.*, 2009). Les petites cellules pré-B n'expriment plus de pré-BCR, expriment une chaîne μ cytoplasmique, et réarrangent les loci de chaîne légère. Une chaîne légère définitive peut finalement s'associer à la chaîne lourde : la cellule exprime alors un BCR (*B cell receptor*) de type IgM à sa surface, et franchit le stade de différenciation suivant, le stade B immature (**Figure 3**). L'expression du BCR est indispensable pour la suite de la maturation et pour la survie à la périphérie (Lam et *al.*, 1997). De nombreux facteurs de transcription et cytokines régulent les phases précoces de la lymphopoïèse B (pour revues : Kurosaki, 2010 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010).

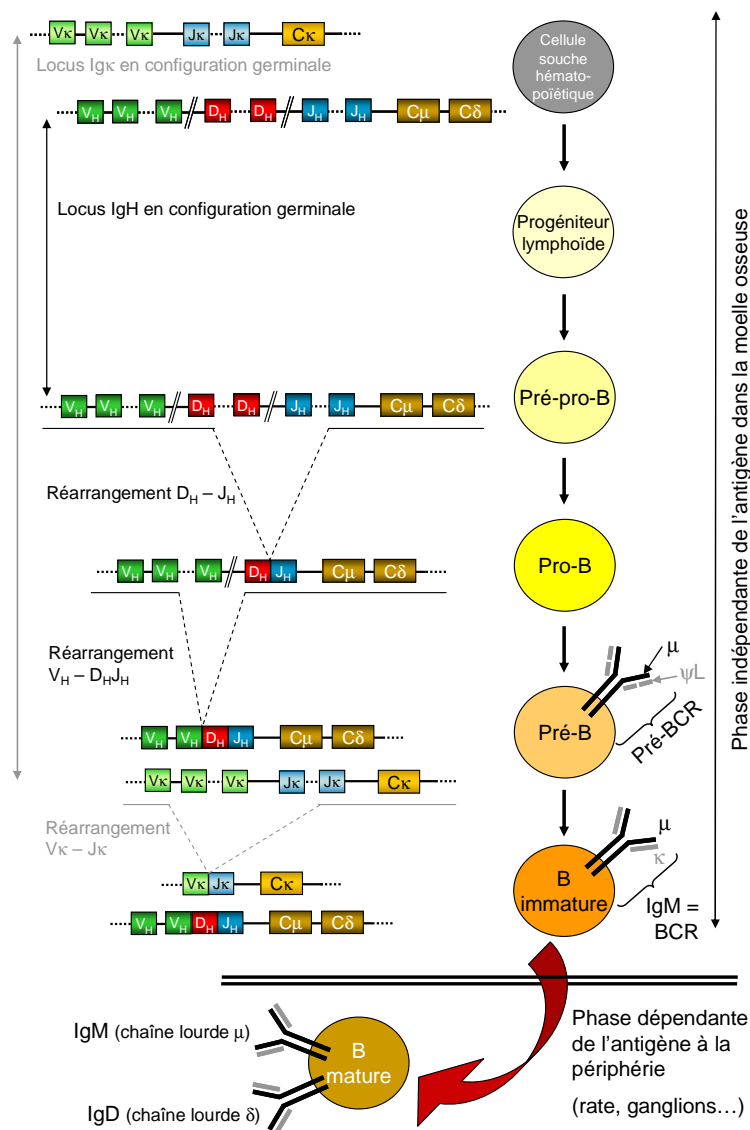


Figure 3. Schéma simplifié des principales étapes du développement B précoce.

1.2. Phase tardive de la lymphopoïèse : à la recherche de l'antigène...

Avant de quitter la moelle osseuse, les cellules B immatures sont testées pour leur auto-réactivité (Goodnow et *al.*, 1990). Les cellules auto-réactives, potentiellement dangereuses pour l'intégrité de l'organisme, ne peuvent quitter la moelle osseuse en l'état. Selon l'affinité entre le BCR auto-réactif et l'auto-antigène, la cellule auto-réactive peut entrer en apoptose, en anergie, en ignorance immunologique ou corriger son récepteur (*receptor editing*) (Manjarrez-Orduno et *al.*, 2009). Les cellules B immatures non autoréactives, ou exprimant une faible densité de BCR autoréactifs (Gaudin et *al.*, 2004), survivent et gagnent la périphérie (sélection positive). Les cellules B immatures répondent aux antigènes thymo-indépendants, comme les lipopolysaccharides (LPS) : elles déclenchent une réponse anticorps très rapide sans la contribution de cellules T dépendantes de la présentation de l'antigène associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Coutinho et Moller, 1975). Les cellules B immatures doivent également passer par une

Contexte bibliographique

phase transitionnelle au cours de laquelle une faible signalisation du BCR inhibe l'apoptose, tandis qu'une signalisation excessive induit l'apoptose (Wang et *al.*, 2007). Les cellules B immatures de la rate sont les cellules B transitionnelles (cellules B T1, puis T2), qui commencent à exprimer l'IgD, et subdivisées en différents sous-stades de développement (**Figure 4**). Les cellules T1 (IgM^{high} IgD^{low} CD21^{low}, CD23⁻ CD24^{high}) sont présentes dans les manchons lymphoïdes péri-artériolaires de la rate. Elles continuent à être évaluées pour leur tolérance du soi : lorsqu'elles survivent à la sélection négative, elles deviennent des cellules T2 (IgM^{low} IgD^{high} CD21^{high}, CD23⁺ CD24^{low}) et occupent les follicules primaires de la rate (Loder et *al.*, 1999). Une troisième sous-population, les cellules T3, a été définie : ce sont des cellules B transitionnelles auto-réactives maintenues dans un état anergique (Merrell et *al.*, 2006) (pour revue : Rolink et *al.*, 2004).

Les cellules B T2 poursuivent leur maturation et deviennent des cellules B matures naïves (**Figure 4**). Selon la structure histologique qu'elles colonisent, leur phénotype et leur fonction, elles peuvent être des cellules B folliculaires, également appelées cellules B2 conventionnelles, des cellules B de la zone marginale ou des cellules B1 (pour revues : LeBien et Tedder, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010). Les cellules B folliculaires, IgM^{low} IgD^{high} CD5⁻ CD23⁺, sont présentes dans les follicules primaires, autour des cellules dendritiques folliculaires, dans la pulpe blanche de la rate ou les ganglions lymphatiques. Elles peuvent alors rencontrer leur antigène spécifique. S'il est thymo-dépendant, les cellules B activées migrent dans la zone extrafolliculaire et interagissent avec des cellules T préalablement activées (par le même antigène). Les cellules B vont alors connaître deux destinées. D'une part, une partie d'entre elles se différencie en plasmocytes extrafolliculaires à courte durée de vie, qui produisent rapidement des anticorps de type IgM et assurent ainsi la première ligne de défense humorale contre l'antigène. D'autre part, la seconde partie des cellules migre dans le follicule primaire, se différencie en centroblastes et induit la réaction du centre germinatif (pour revues : Allen et *al.*, 2007 ; Klein et Dalla-Favera, 2008). Les cellules B folliculaires naïves sont repoussées à la périphérie du follicule par les centroblastes et définissent alors la zone du manteau. Une fois qu'il a acquis un centre germinatif et un manteau, le follicule primaire devient un follicule secondaire. Les centroblastes subissent une expansion clonale et l'hypermutation somatique (paragraphe 2.2), avant de se différencier en centrocytes. Les centrocytes sélectionnés positivement activent les cellules T du centre germinatif, sont induites à proliférer et peuvent réaliser la commutation de classe (paragraphe 2.3). Les cellules dendritiques folliculaires sont également impliquées (Aydar et *al.*, 2005). Enfin, les cellules B du centre germinatif se différencient en plasmocytes, les cellules effectrices de l'immunité humorale (Fairfax et *al.*, 2008 ; Shapiro-Shelef et Calame, 2005), ou en cellules B mémoires (Tangye et Tarlinton, 2009), cellules à longue durée de vie (**Figure 4**). Elles quittent le centre germinatif, peuvent retourner dans la circulation, résider dans les organes lymphoïdes secondaires, ou recoloniser la moelle osseuse (plasmocytes) (pour revues :

Allman et Pillai, 2008 ; Casola, 2007 ; Klein et Dalla-Favera, 2008 ; Kurosaki, 2010 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Monson, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010).

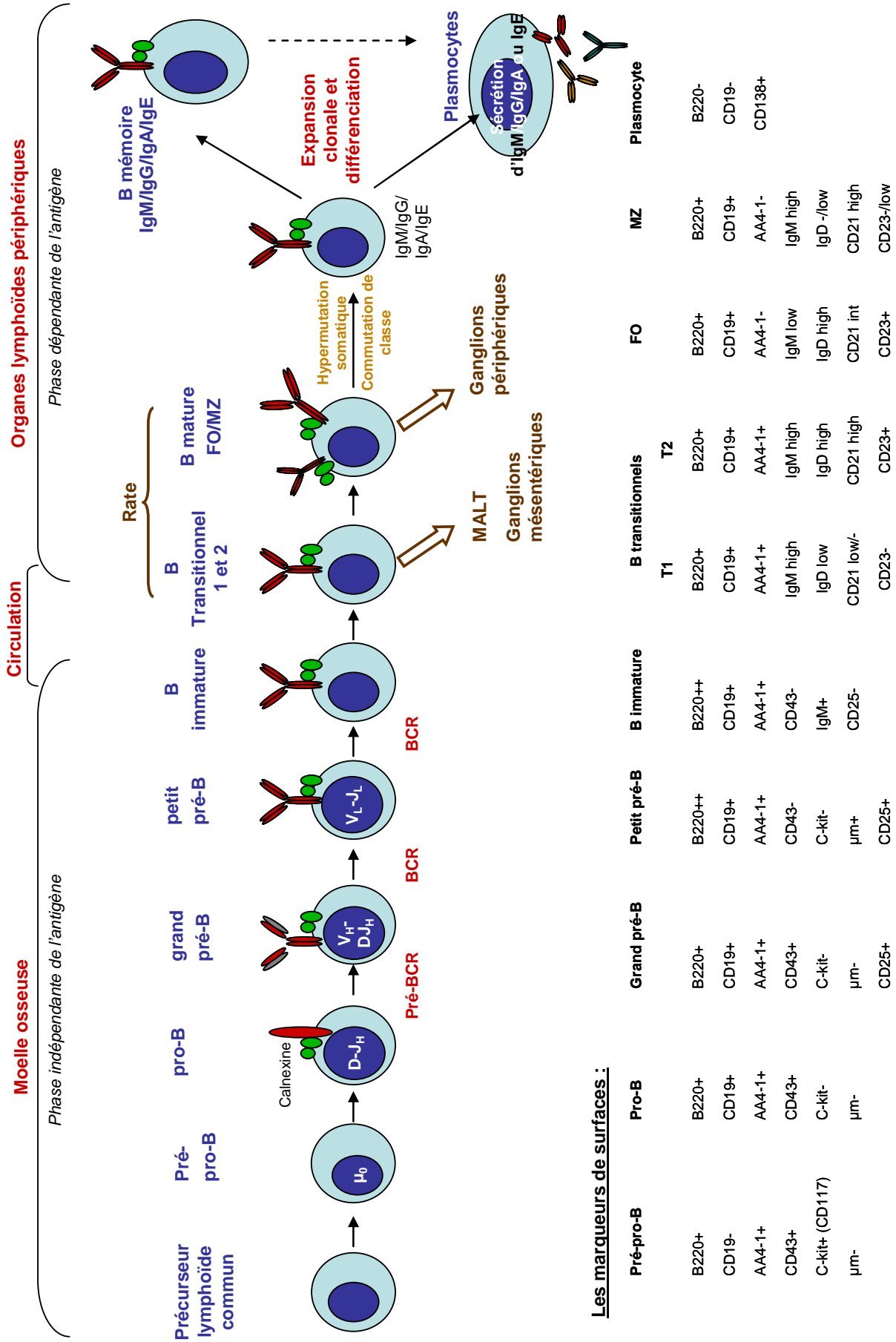
Les cellules B de la zone marginale, de phénotype $IgM^{high} IgD^{low} CD21^{high} CD23^{-} CD24^{dim}$, occupent la zone marginale de la rate, située à la limite externe de la pulpe blanche, bordée vers l'intérieur par le sinus de la zone marginale et vers l'extérieur par la pulpe rouge (Mebius et Kraal, 2005). Les cellules B de la zone marginale érigent une première ligne de défense contre les antigènes véhiculés par le sang (Zandvoort et Timens, 2002). Elles ne semblent pas nécessiter la présence de cellules T pour être activées et sélectionnées : en effet, elles existent chez les souris *nude*² ou thymectomisées (Kumararatne et MacLennan, 1982). Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes performantes. En outre, lorsqu'elles reconnaissent un antigène thymo-indépendant, elles prolifèrent et se différencient en plasmocytes, qui sécrètent des anticorps de basse affinité plus rapidement que les cellules B folliculaires (Oliver et *al.*, 1999). Elles permettent une intervention immunitaire intermédiaire entre la réponse innée précoce et la réponse adaptative plus lente médiée par les anticorps issus des cellules B folliculaires (Lopes-Carvalho et Kearney, 2004) (pour revues : Allman et Pillai, 2008 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010 ; Weill et *al.*, 2009). Les cellules B1 se caractérisent par l'expression de CD5 (Kantor, 1991). Elles sont particulièrement abondantes dans les cavités pleurales et péritonéales, absentes dans les ganglions lymphatiques et ne représentent qu'un infime pourcentage des cellules B matures spléniques. Plus précisément, toutes les cellules B1 expriment l'ARN messager (ARNm) de CD5, mais seule une partie d'entre elles exprime la protéine à leur surface : les cellules B1a ($CD11b^{+} CD5^{+}$), les cellules B1b étant de phénotype $CD11b^{+} CD5^{-}$ (Stall et *al.*, 1992). Les progéniteurs des cellules B1a sont abondants dans le foie fœtal mais absents dans la moelle osseuse adulte, tandis que des progéniteurs de cellules B1b sont présents dans la moelle osseuse. Par ailleurs, les cellules B1 sont capables d'autorenouvellement : elles peuvent se reconstituer chez l'adulte par division de cellules B1 matures. Les cellules B1 produisent des IgM (principalement dans la rate) et des IgA (surtout au niveau de la *lamina propria*). Les cellules B1a produisent des anticorps naturels et assurent donc la protection innée contre les infections bactériennes. Les cellules B1b constituent la principale source de réponses anticorps à long terme contre les polysaccharides et autres antigènes thymo-indépendants au cours de l'infection (Haas et *al.*, 2005) (pour revues : Allman et Pillai, 2008 ; Casola, 2007 ; LeBien et Tedder, 2008 ; Samitas et *al.*, 2010).

Page suivante :

Figure 4. Les étapes du développement des lymphocytes B conventionnels.

Inspirée de Benschop et Cambier, 1999 ; Hardy et Hayakawa, 2001.

² Les souris *nude* ont une mutation qui empêche le développement de l'épithélium cortical thymique. Elles se distinguent des souris *scid* (*severe combined immunodeficient*) qui portent une mutation qui affecte l'activité récombinase nécessaire aux réarrangements génomiques qui permettent l'expression des récepteurs antigéniques des cellules B et T.



2. LES EVENEMENTS GENIQUES DE LA LYMPHOPOÏESE B

La lymphopoïèse B est jalonnée par le réarrangement et le remaniement des segments géniques des loci d'immunoglobuline, d'abord au niveau des régions variables (acquisition de la spécificité antigénique), puis des régions constantes (modulation des fonctions effectrices). Le lymphocyte B peut se définir comme une cellule qui exprime à sa surface des récepteurs clonaux de type immunoglobulines qui reconnaissent des épitopes antigéniques spécifiques (LeBien et Tedder, 2008). Dans le cadre de notre thèse, nous nous sommes intéressé particulièrement au locus *IgH*.

2.1. Les recombinaisons V(D)J

Les régions variables des immunoglobulines sont codées par l'association d'un segment V, d'un segment D (spécifique de la chaîne lourde) et d'un segment J au terme du processus de recombinaison V(D)J. Il est à l'origine de l'importante diversité de spécificité des immunoglobulines. En effet, dans le cas de la chaîne lourde, les segments V_H contiennent les séquences codant deux des trois CDR du site de reconnaissance de l'antigène dans la molécule d'immunoglobuline. Les séquences de ces deux CDR sont différentes d'un segment germinale V_H à l'autre et créent donc une diversité germinale (premier niveau de diversité). La troisième CDR est codée par la jonction entre les trois segments V_H , D et J_H . L'association aléatoire de trois segments germinaux V_H , D et J_H est à l'origine d'une diversité somatique combinatoire (deuxième niveau de diversité). Enfin, la diversité est encore augmentée par le remaniement de la séquence nucléotidique aux jonctions entre segments (délétions et ajouts de nucléotides) lors de la recombinaison VDJ : ce troisième niveau de diversité résulte de la réparation imprécise de cassures dans l'ADN double brin (pour revues : Dudley et al., 2005 ; Jung et *al.*, 2006 ; Schatz, 2004).

Les segments géniques V, D et J sont flanqués par des séquences spécifiques appelées « séquences signal de recombinaison » SSR (pour revue : Tonegawa, 1993). Une SSR est constituée d'une séquence consensuelle conservée de 7 pb, l'heptamère (5'-CACAGTG-3') et d'une séquence consensuelle conservée de 9 pb, le nonamère (5'-ACAAAACC-3'), séparées par une séquence non conservée de 12 (un tour de l'hélice d'ADN) ou 23 pb (deux tours d'hélice). Les SSR sont présentes en 3' des segments V, de part et d'autre des segments D et en 3' des segments J. La recombinaison V(D)J est un processus de recombinaison site-spécifique qui ne peut se produire qu'entre deux segments géniques qui contiennent une SSR avec un séparateur de 12 pb pour l'un et une SSR avec

Contexte bibliographique

un séparateur de 23 pb pour l'autre. C'est la « règle 12/23 » qui permet d'éviter des réarrangements illégitimes entre segments (**Figure 5**) (Meek et *al.*, 1989 ; Bassing et al., 2002 ; Dudley et *al.*, 2005 ; Jung et *al.*, 2006).

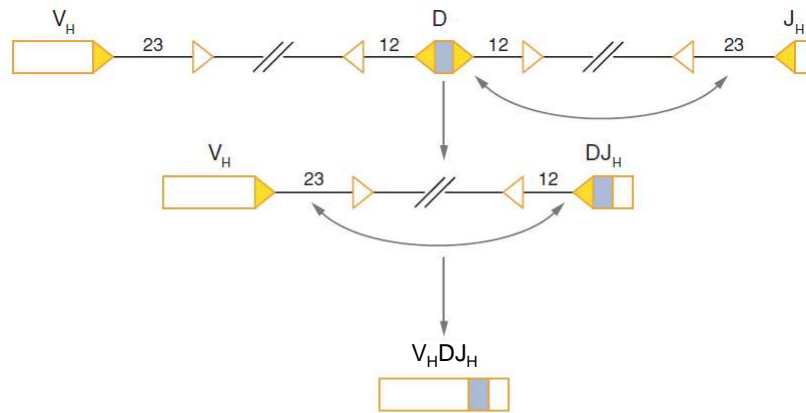


Figure 5. Réarrangement des gènes de région variable de chaîne lourde d'immunoglobuline et règle 12/23.

Dans les SSR, les heptamères sont représentés par des triangles jaunes et les nonamères par des triangles blancs. La longueur des espaceurs est indiquée au-dessus du trait. La recombinaison n'est initiée qu'entre des segments bordés par des SSR de longueur différente. D'après Jung et *al.*, 2006.

Les recombinaisons V(D)J font appel à un complexe enzymatique constitué par l'association des produits des gènes *RAG-1* et *RAG-2* : la recombinase RAG (Schatz et *al.*, 1989 ; Oettinger et *al.*, 1990). Les protéines RAG s'associent avec les SSR à 12 pb et 23 pb et aux segments géniques associés dans un complexe synaptique. Les RAG créent une cassure simple brin entre les deux séquences codantes (segments géniques) devant être jointes et leur SSR associée (cassure à la jonction segment-heptamère). Elles catalysent ensuite une réaction de *trans*-estérification au cours de laquelle l'extrémité 3'-OH libre du brin d'ADN des séquences codantes rejoint le brin d'ADN opposé formant ainsi une épingle à cheveux. On obtient ainsi deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5'. Celles-ci sont scellées directement pour former les jonctions signal. Les extrémités codantes fermées doivent être ouvertes et remaniées avant leur jonction. Après ouverture, l'extrémité saillante est complétée par l'addition de nucléotides complémentaires (nucléotides P). Alternativement, des nucléases peuvent aussi éliminer les nucléotides saillants (perte de nucléotides germinaux). Les jonctions sont également diversifiées par des additions de nucléotides N par la désoxynucléotidyltransférase terminale (TdT, *terminal desoxynucleotidyltransferase*) (**Figure 6**).

La résolution des extrémités implique la voie ubiquitaire NHEJ (*Non Homologous End Joining*), principale voie de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules de mammifères (pour revue, Lieber et *al.*, 2010b). Elle formera des jonctions des extrémités signal précises et des jonctions des extrémités codantes imprécises. La voie NHEJ fait appel à plusieurs facteurs : Ku70 et

Ku80, DNA-PKcs (sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante), Artemis, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), DNA Ligase IV, Cernunnos/XLF (*XRCC4-like factor*) (Rooney *et al.*, 2004 ; Dudley *et al.*, 2005, Sekiguchi et Fergusson, 2006) (**Figure 6**).

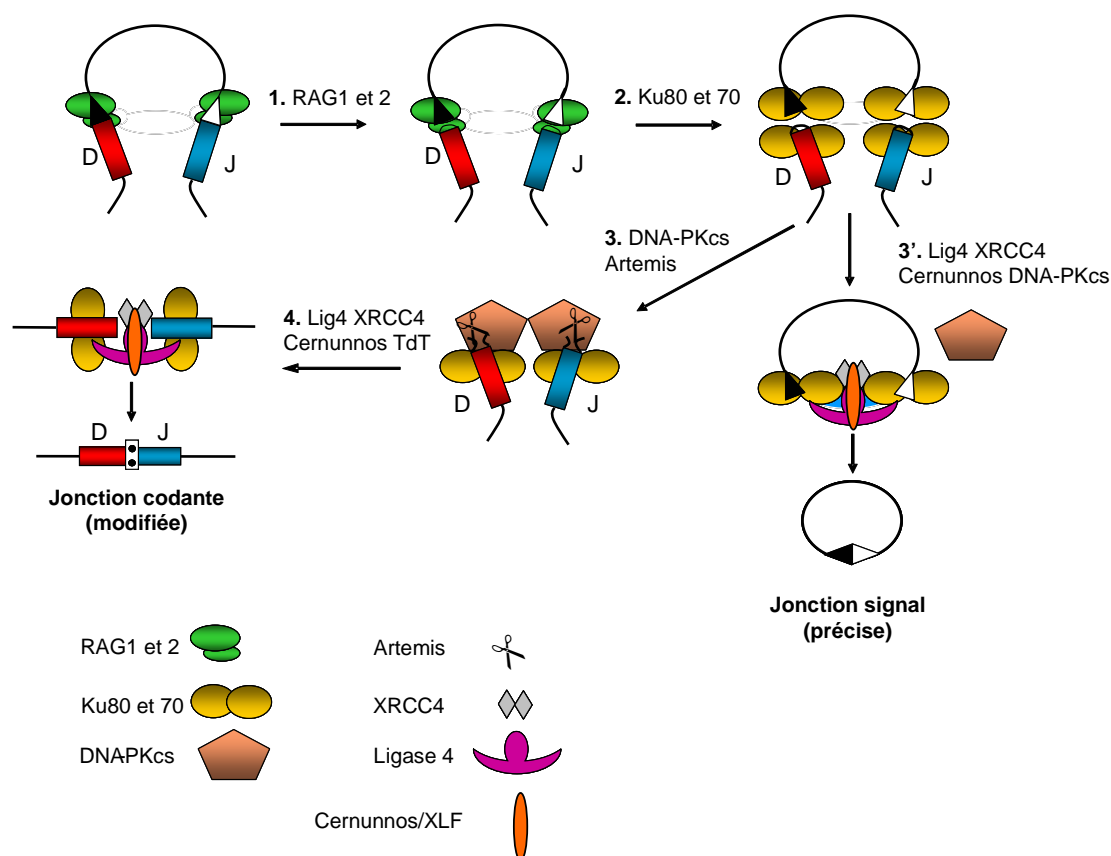


Figure 6. Mécanismes des recombinaisons VDJ. Résolution des coupures double brin induites par les RAG.

1. Les coupures sont réalisées par les RAG au niveau des SSR. 2. Ku70 et Ku80 se lient aux extrémités coupées de l'ADN. 3. DNA-PKcs facilite l'ouverture des structures en épingle à cheveux générées par les RAG. 3' et 4. TdT ajoute des nucléotides au niveau des extrémités codantes. XRCC4, Cernunnos et DNA ligase 4 relient les extrémités franches formées et produisent des jonctions codantes modifiées. D'après Dudley *et al.*, 2005.

2.2. L'hypermutation somatique

L'organisme est parfois confronté à des situations où les fonctions biologiques dépassent le contenu des informations du génome. Par exemple, le système immunitaire adaptatif doit faire face à la nécessité de constituer un répertoire anticorps potentiellement infini à partir d'une information génétique limitée. Le nombre d'anticorps différents produits par l'organisme au cours de la vie dépasse largement la capacité du génome. La cellule B surmonte cet écueil en induisant des altérations somatiques au niveau des loci des gènes d'immunoglobulines à un moment précis de son développement : c'est l'hypermutation somatique, qui a lieu dans les centres germinatifs, au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Grâce à elle, en seulement quelques jours qui suivent la rencontre avec l'antigène, les gènes qui codent des anticorps de faible affinité pour cet antigène deviennent des gènes codant des anticorps de haute affinité. On parle aussi de maturation d'affinité.

Contexte bibliographique

L'hypermutation somatique consiste en l'accumulation de mutations touchant une seule base principalement au niveau de la région codante V(D)J et des introns de la région J. La fréquence de mutation est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} /pb/génération ; comparativement, le taux basal de mutation dans le génome est d'environ 10^{-9} /pb/génération. Les mutations commencent à s'accumuler environ 150 pb en aval du promoteur pV_H et s'étendent sur 1 à 2 kb. La fréquence de mutations diminue ensuite avec l'éloignement par rapport au promoteur. Les mutations s'accumulent également dans des régions de 4 à 7 kb autour des régions S (Xue et *al.*, 2006 ; voir aussi paragraphe 2.3). Dans l'hypermutation somatique, les mutations sont plus fréquemment des transitions que des transversions. Une transition est une mutation qui change une pyrimidine en une autre pyrimidine (C ↔ T) ou une purine en une autre purine (G ↔ A). Une transversion est une mutation qui change une pyrimidine (C ou T) en purine (G ou A), ou inversement. Les quatre bases peuvent être touchées, et chez l'homme et la souris, les paires A:T et C:G sont ciblées à une fréquence semblable. Dans les régions ciblées, il existe des « points chauds » et des « points froids » de mutations, où celles-ci seront respectivement fréquentes et rares. Par exemple, les principaux points chauds mutationnels pour les paires C:G sont dans le consensus WRCY (avec W = A/T, R = A/G et Y = C/T). L'hypermutation somatique est organisée en deux phases successives : la déamination des cytidines (1) et sa résolution (2) (pour revues : Di Noia et Neuberger, 2007 ; Maul et Gearhart, 2010a, 2010b ; Peled et *al.*, 2008 ; Teng et Papavasiliou, 2007).

L'hypermutation somatique commence par une déamination ciblée des résidus de déoxycytidine (dC). La déamination convertit la déoxycytidine en déoxyuridine et transforme donc une paire C:G en un mésappariement U:G. Cette étape est catalysée par l'enzyme cytidine déaminase induite après activation, AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu et *al.*, 1999) (**Figure 7**). Elle agit sur l'ADN simple brin mais pas sur des substrats d'ADN double brin. La nécessité de la transcription germinale pour l'induction de l'hypermutation somatique s'explique par la création d'une matrice d'ADN simple brin pour l'action d'AID au sein de la zone de transcription. AID est indispensable pour l'hypermutation somatique (et pour la commutation de classe) (Muramatsu et *al.*, 2000 ; Revy et *al.*, 2000).

Après la déamination induite par AID, plusieurs voies peuvent être empruntées pour réparer la lésion U:G (Di Noia et Neuberger, 2007 ; Peled et *al.*, 2008) (**Figure 7**) :

- la lésion peut être « ignorée » et simplement répliquée, auquel cas les lésions finales produites par l'hypermutation somatique seront des transitions de C à T et de G à A ;

- elle peut également être reconnue et prise en charge par des protéines normalement impliquées dans l'excision de bases (*base excision repair*) ou la réparation des mésappariements (*mismatch repair*).

Au cours de l'hypermutation somatique, la cellule B va détourner des voies de réparation des lésions de l'ADN, qui doivent normalement assurer une reconstitution fidèle du génome lésé. L'utilisation subversive de ces processus lui permettra d'induire des erreurs qui seront source d'une diversité additionnelle.

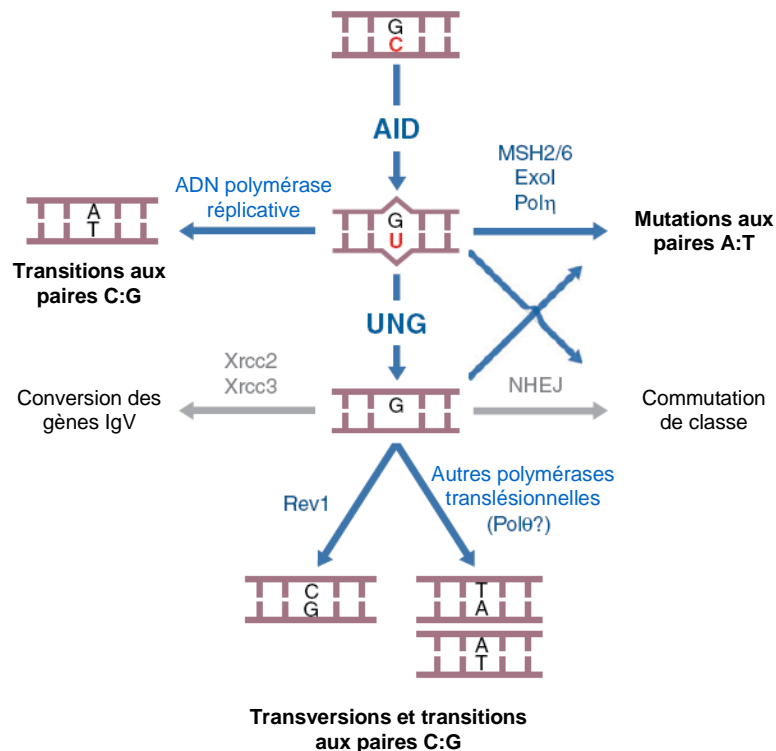


Figure 7. Modèle de déamination de l'ADN pour la diversification des gènes d'immunoglobuline.

Cette figure détaille particulièrement l'hypermutation somatique. La déamination de l'ADN permet aussi d'initier la commutation de classe (paragraphe 2.3) et la conversion des gènes de région variable. La conversion génique est une autre forme de diversification des anticorps, qui a été mise en évidence chez le poulet et qui n'existe pas chez l'homme et la souris (Tang et Martin, 2007). D'après Di Noia et Neuberger, 2007.

2.3. La commutation de classe

Un lymphocyte B est capable de produire un isotype d'immunoglobuline, généralement l'IgM, précocement au cours de son développement, et un autre isotype après la différenciation induite par l'antigène. La commutation de classe est un phénomène de recombinaison spécifique de régions particulières de l'ADN, les régions de commutation, ou régions *switch* (régions S), qui permet le remplacement du gène de la région constante de l'IgM ($C\mu$) par un gène C_H en aval (γ , ϵ ou α) (**Figure 8**). L'isotype de l'immunoglobuline est ainsi modifié tout en conservant la spécificité antigénique. La commutation de classe modifie les fonctions effectrices des anticorps. Elle permet

Contexte bibliographique

l'expression d'anticorps de même affinité (les gènes de la région variable ne sont pas affectés) mais d'un isotype secondaire (IgG, IgE ou IgA), donc dotés d'une fonction effectrice différente. En effet, les actions effectrices des anticorps dépendent de l'interaction de la région constante de la chaîne lourde avec le complément et les récepteurs des fragments Fc à la surface des cellules immunitaires effectrices. La commutation de classe s'apparente à un phénomène de « couper-coller » au sein du génome, assuré d'une part par la réalisation de cassures double brin dans l'ADN au niveau des régions S, d'autre part par la jonction entre une région S donneuse et une région S accepteuse (pour revues : Chaudhuri et Alt, 2004 ; Dudley et *al.*, 2005 ; Min et Selsing, 2005 ; Stavnezer et *al.*, 2008).

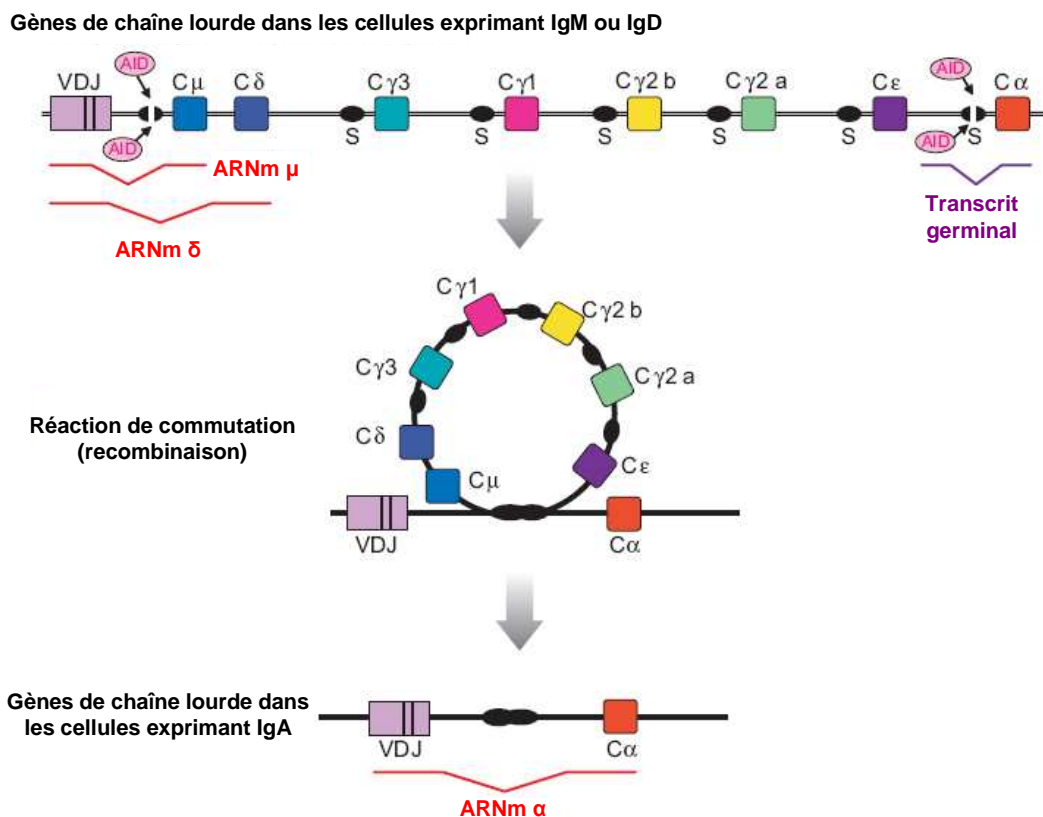


Figure 8. Diagramme représentant la commutation de classe vers IgA (chez la souris).

Les schémas d'épissage des ARNm μ et δ et le transcrit germinale α sont représentés sous le locus, en haut de la figure. Des transcrits germinaux semblables sont induits à partir des gènes Cγ, Cε et Cα en fonction de la stimulation reçue par la cellule B. D'après Stavnezer et *al.*, 2008.

Les cassures d'ADN sont initiées par AID qui induit une déamination de C en U sur un seul brin d'ADN, qui aboutira à une cassure simple brin (Muramatsu et *al.*, 2000 ; Nambu et *al.*, 2003 ; Revy et *al.*, 2000). La réalisation des cassures nécessaires à la commutation de classe est assurée par la voie de réparation par excision de bases, dont les enzymes, notamment UNG, excisent le résidu dU mésapparié (Imai et *al.*, 2003 ; Rada et *al.*, 2002 ; Schader et *al.*, 2005). Dans un deuxième temps, les endonucléases apuriques-apyrimidiques (APE) incisent le squelette sucre-carbone au niveau des sites abasiques générés par UNG, produisant ainsi des cassures simple brin (Guikema et *al.*, 2007). Deux mécanismes peuvent convertir une cassure simple brin en cassure double brin :

- si deux cassures simple brin réalisées lors de la réparation par excision de base sont proches l'une de l'autre sur les brins opposés, elles peuvent former spontanément une cassure double brin ;
- sinon, c'est la machinerie de réparation des mésappariements qui transforme deux cassures simple brin éloignées en une cassure double brin. Les mésappariements U:G non pris en charge par UNG-APE favorisent le recrutement de l'exonucléase EXO1 au niveau de la cassure simple brin en 5' la plus proche générée par AID-UNG-APE. Ensuite, EXO1 excise le brin d'ADN en direction du dU mésapparié et jusqu'à la prochaine cassure simple brin sur le brin d'ADN opposé (Eccleston et *al.*, 2009 ; Schrader et *al.*, 1999, 2007).

Enfin, les extrémités 5' ou 3' simple brin chevauchantes qui persistent après la formation des cassures double brin doivent être remaniées (excision ou comblement) pour créer des extrémités cohésives ou quasi-cohésives adaptées à une jonction des extrémités avec une autre région S.

Les régions S ne présentent pas suffisamment d'homologie pour être réarrangées par recombinaison homologue. C'est donc un mécanisme de jonction des extrémités qui permettra la recombinaison S-S. Les régions S sont localisées à plusieurs dizaines de kb (jusqu'à environ 175 kb) les unes des autres. Lors de la commutation de classe, les deux régions S impliquées doivent donc être rapprochées et juxtaposées au sein d'une structure de type synapse (synapse S-S) afin qu'elles soient jointes, et pour réaliser ainsi une recombinaison efficace. La jonction des régions S fait intervenir de nombreux facteurs impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN : le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), 53BP1, H2AX phosphorylée (γ H2AX), les facteurs de la NHEJ... (pour revues : Dudley et *al.*, 2005 ; Stavnezer et *al.*, 2008).

3. ESSENTIELLE ET BENEFIQUE, MAIS...

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, ces modifications génétiques qui jalonnent le développement physiologique du lymphocyte B sont essentielles pour assurer une réponse immunitaire normale, mais elles occasionnent des dommages à l'ADN qui ouvrent la voie aux translocations chromosomiques. Celles-ci induisent un développement pathologique du lymphocyte B qui aboutit à l'émergence de lymphomes et de leucémies.

La lymphomagenèse

Quand le lymphocyte B tombe malade...

Des lymphomes et leucémies peuvent apparaître lorsque la différenciation et l'activation normales des lymphocytes sont perturbées. Quatre-vingt quinze pourcents des lymphomes sont d'origine B. Les différents stades du développement normal des lymphocytes B possèdent des contreparties malignes qui reflètent l'expansion d'un clone dominant conduisant à l'émergence d'un lymphome ou d'une leucémie. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé distingue une quinzaine de types de lymphomes B (**Tableau 1**) (pour revues : Küppers, 2005 ; Lenz et Staudt, 2010 ; Shaffer et *al.*, 2002).

1. LES DANGERS DE LA LYMPHOPOÏÈSE

La lymphopoïèse est, d'une certaine façon, une catastrophe en suspend, une épée de Damoclès pour la cellule. En effet, comme nous venons de le voir dans le précédent chapitre, les lymphocytes B (les lymphocytes T également) mettent leur intégrité génomique en danger lors de la formation et de la révision de leur récepteur à l'antigène. Ensuite, la réponse à l'antigène induit à son tour des événements potentiellement dangereux. En effet, la recombinaison V(D)J, dans la moelle osseuse, est un processus à risque, car il nécessite des cassures double brin de l'ADN, réalisées par RAG-1 et RAG-2. Ces cassures peuvent être résolues de façon aberrante et être à l'origine de translocations chromosomiques. De même, l'hypermutation somatique et la commutation de classe créent des cassures dans l'ADN et peuvent de ce fait prédisposer aux translocations chromosomiques (Lenz et Staudt, 2010 ; Shaffer et *al.*, 2002).

La plupart des lymphomes B portent les stigmates de translocations chromosomiques qui déplacent des oncogènes³ au sein des loci d'immunoglobuline. Les oncogènes passent alors sous le contrôle des éléments régulateurs actifs du locus, ce qui favorise leur expression constitutive et dérégulée (Klein, 1986). Trois types de points de cassure sont observés aux loci d'immunoglobuline (Küppers, 2005) (**Figure 9**) :

³ Un oncogène est un gène qui, lorsqu'il est surexprimé, induit l'apparition et/ou le développement d'une tumeur. Avant d'être dérégulé, dans le contexte physiologique, il est qualifié de proto-oncogène et joue un rôle essentiel dans des étapes importantes de la croissance cellulaire ou tissulaire.

Contexte bibliographique

- le point de cassure peut être directement adjacent aux segments D ou aux segments J : la translocation résulte d'une erreur lors de la recombinaison V(D)J. C'est par exemple le cas des translocations *Bcl-2-IgH* ou *CCND1-IgH* (cycline D1-*IgH*) respectivement associées au lymphome folliculaire et au lymphome du manteau ;
- la cassure peut être réalisée à l'intérieur ou au voisinage de l'exon V(D)J réarrangé, ciblé par l'hypermutation somatique : la translocation dérive de celle-ci. C'est le cas de la translocation *c-myc-IgH* lors du lymphome de Burkitt endémique ;
- le point de cassure peut enfin se trouver dans les régions S des segments géniques de région constante : la translocation résulte d'une tentative de commutation de classe. C'est le cas de la translocation de *c-maf*, des gènes de la cycline D1 et D3 lors du myélome multiple.

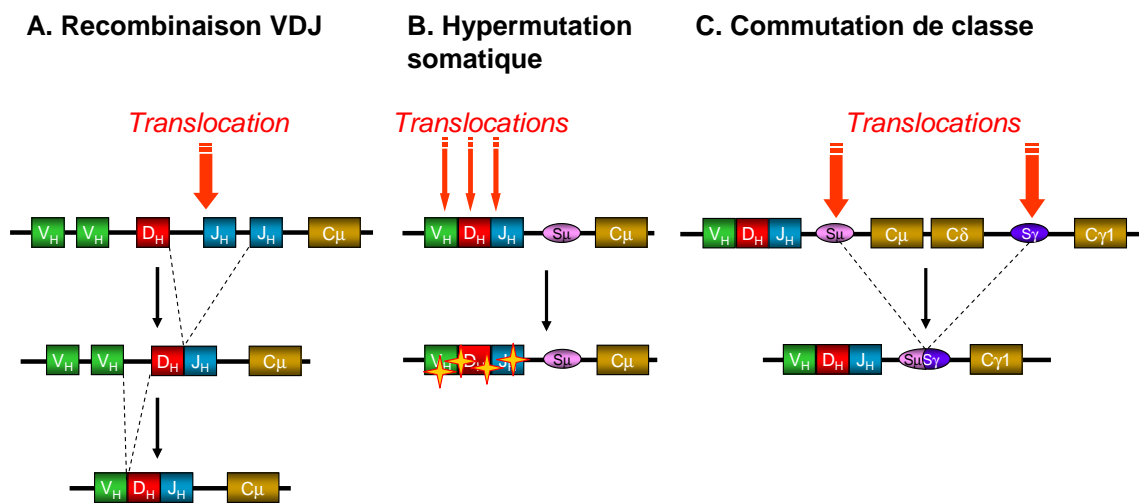


Figure 9. Les mécanismes moléculaires responsables du remodelage des gènes de chaîne lourde d'immunoglobuline, et les trois points critiques de cassure et de translocation au locus *IgH*.

Les sites de cassure et de réarrangement sont indiqués par des flèches rouges. En B, les étoiles jaunes bordées de rouge symbolisent les événements d'hypermutation somatique. D'après Küppers, 2005.

De nombreuses études récentes ont permis d'élucider en grande partie l'origine des cassures d'ADN dans les loci des oncogènes. Nous en discuterons dans le paragraphe consacré aux mécanismes des translocations. Nous évoquerons aussi plus en détail la formation des cassures aux loci d'immunoglobuline. Le rôle spécifique de la 3'RR dans la dérégulation des oncogènes transloqués, qui a fait l'objet de plusieurs travaux, dont certains menés au laboratoire, est discuté dans le chapitre suivant et présenté dans deux revues récentes (Pinaud et *al.*, 2011 ; Vincent-Fabert et *al.*, 2010).

Bien que les translocations chromosomiques impliquant les loci d'immunoglobuline soient les principaux événements oncogéniques associés à la lymphomagenèse, d'autres événements transformants peuvent aussi être impliqués : des mutations de gènes suppresseurs de tumeur, des amplifications génomiques, des translocations n'impliquant pas les loci d'immunoglobuline. Des

virus, comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), peuvent transformer les cellules B (Küppers, 2005) (Tableau 2).

Tableau 1. Les lymphomes B humains matures.

Lymphoma	Features	Frequency among lymphomas (%)*	Proposed cellular origin
B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)	Leukaemia of small B cells that express the CD5 antigen, involving peripheral-blood and bone-marrow cells. Common in elderly patients. Called 'small lymphocytic lymphoma' when lymph-node cells are predominantly involved. Patients with leukaemia cells that lack variable (V)-region gene mutations have a worse prognosis than patients with mutations in V-region genes.	7	Memory B cell? Naive B cell? Marginal-zone B cell?
Mantle-cell lymphoma	Lymphoma arises from cells that populate the mantle zone of follicles, express CD5 and show aberration in cyclin-D1 expression. Nearly all cases are associated with <i>BCL1-IgH</i> translocation.	5	CD5+ mantle-zone B cell
B-cell prolymphocytic leukaemia	Chronic B-cell malignancy related to B-CLL. Over 50% of cancer cells represent prolymphocytes (large lymphocytes with clumped chromatin and prominent nucleolus).	<1	Memory B cell
Follicular lymphoma	A nodal lymphoma with a follicular growth pattern. Lymphoma cells morphologically and phenotypically resemble GC B cells. Most cases are associated with <i>BCL2-IgH</i> translocation.	20	GC B cell
Hairy-cell leukaemia	Chronic B-cell malignancy involving spleen and bone marrow. Very few circulating leukaemia cells. Tumour cells form 'hairy' projections.	<1	Memory B cell
MALT lymphoma	Extranodal marginal-zone B-cell lymphoma. Develops mostly in aquired lymphoid structures.	7	Marginal-zone B cell
Nodal marginal-zone lymphoma	Lymphoma with primary presentation in lymph nodes. Lymphoma cells resemble marginal-zone or monocytoid B cells, but often have heterogenous cytology, which ranges from small to large lymphocytes and includes plasma cells.	2	Marginal-zone B cell? Monocytoid B cell?
Splenic marginal-zone lymphoma	Micronodular lymphoid infiltration in the splenic white pulp. Mostly small IgD+ lymphoma cells that replace normal follicles and the marginal-zone region. Frequently involves infiltration into bone marrow and circulation.	1	Subset of naive B cells that have partially differentiated into marginal-zone B cells?
Burkitt's lymphoma	Fast growing. Mostly extranodal. Characterized by a <i>MYC-Ig</i> translocation. Patients with endemic form are EBV-positive in nearly all cases. Patients with sporadic form are EBV-positive in about 30% of cases.	2	GC B cell
Diffuse large B-cell lymphoma	Heterogenous group of lymphomas characterized by large B cells. Several subtypes are recognized. Morphological variants include centroblasts and immunoblasts.	30-40	GC or post-GC B cell
Primary mediastinal B-cell lymphoma	Subtype of diffuse large B-cell lymphoma located in the mediastinum. Tumour cells are large B cells but also show a number of similarities to Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma. Most frequently occurs in young women.	2	Thymic B cell
Post-transplant lymphoma	Mostly of the diffuse large-cell lymphoma type. Lymphomas that arise in patients after organ transplantation. Immunosuppressive treatment confers risk of uncontrolled proliferation of EBV-infected B cells that can develop into lymphomas.	<1	GC B cell
Primary effusion lymphoma	Frequently occurs in patients with AIDS or patients who have received organ transplants. Lymphoma cells are found as effusions in serous cavities, such as pleura, pericardium or peritoneum.	<0.5	(Post) GC B cell
Lymphoplasmacytic lymphoma	Involves lymph nodes, bone marrow and spleen. The tumour-cell population is composed of small B cells, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells. Most patients present with a serum monoclonal protein, usually of the IgM type.	1	(Post) GC B cell
Multiple myeloma	Neoplastic proliferation of plasma cells in the bone marrow.	10	Plasma cell
Classical Hodgkin's lymphoma	Characterized by bizarre, large tumour cells. Hodgkin and Reed-Sternberg cells account for less than 1% of cells in the tumour, and are admixed with various non-neoplastic cell types. Tumour cells show a phenotype not characteristic of any normal haematopoietic cell type.	10	Defective GC B cell
Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma	Rare indolent subtype of Hodgkin's lymphoma. Lymphoma cells show a B-cell phenotype, represent a small population in the tissue, and grow in association with follicular dendritic cells and T-helper cells. Good prognosis.	0.5	GC B cell

* Les pourcentages désignent les fréquences en Europe et en Amérique du Nord. Extrait de Küppers, 2005.

Contexte bibliographique

Tableau 2. Les mécanismes de la lymphomagenèse des cellules B.

Lymphoma	Chromosomal translocations	Tumour-suppressor gene mutations	Viruses	Other alterations
Mantle-cell lymphoma	<i>CCND1-IgH</i> (95) ¹⁰⁷	<i>ATM</i> (40) ^{108,109}		Deletion on 13q14 (50-70) ^{110*}
B-cell chronic lymphocytic leukaemia	–	<i>ATM</i> (30) ^{111,112} , <i>TP53</i> (15) ¹¹³	–	Deletion on 13q14 (60) ^{114*}
Follicular lymphoma	<i>BCL2-IgH</i> (90) ¹²⁻¹⁴	–	–	–
Diffuse large B-cell lymphoma	<i>BCL6</i> -various (35) ^{115,116} , <i>BCL2-IgH</i> (15-30) ¹¹⁷ , <i>MYC-IgH</i> or <i>MYC-IgL</i> (15) ¹¹⁸	<i>CD95</i> (10-20) ²⁵ , <i>ATM</i> (15) ¹¹⁹ , <i>TP53</i> (25) ^{120,121}	–	Aberrant hypermutation of multiple proto-oncogenes (50) ¹⁸
Primary mediastinal B-cell lymphoma	–	<i>SOCS1</i> (40) ¹²²	–	Aberrant hypermutation of multiple proto-oncogenes (70) ¹²³
Burkitt's lymphoma	<i>MYC-IgH</i> or <i>MYC-IgL</i> (100) ^{124,125}	<i>TP53</i> (40) ¹¹³ , <i>RB2</i> (20-80) ¹²⁶	EBV (endemic, 95; sporadic, 30) ²⁸	–
Post-transplant lymphomas	–	–	EBV (90) ²⁸	–
Classical Hodgkin's lymphoma	–	<i>IKBA</i> (10-20) ¹²⁷⁻¹²⁹ , <i>IKBE</i> (10) ¹³⁰ , <i>CD95</i> (<10) ¹³¹	EBV (40) ²⁸	<i>REL</i> amplifications (50) ¹³²
Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma	<i>BCL6</i> -various (48) ¹³³	–	–	–
Splenic marginal-zone lymphoma	–	–	–	Deletion on 7q22-36 (40) ^{134*}
MALT lymphoma	<i>API2-MALT1</i> (30) ¹³⁵ , <i>BCL10-IgH</i> (5) ^{136,137} , <i>MALT1-IgH</i> (15-20) ¹³⁸ , <i>FOXP1-IgH</i> (10) ¹³⁹	<i>CD95</i> (5-80) ^{25,140,141†}	Indirect role of <i>Helicobacter pylori</i> in gastric MALT lymphomas ⁸⁵	–
Lymphoplasmacytoid lymphoma	<i>PAX5-IgH</i> (50) ¹⁴²	–	–	–
Primary effusion lymphoma	–	–	HHV8 (95) ¹⁴³ , EBV (70) ²⁸	–
Multiple myeloma	<i>CCND1-IgH</i> (15-20) ¹⁴⁴ , <i>FGFR3-IgH</i> (10) ¹⁴⁵ , <i>MAF-IgH</i> (5-10) ¹⁴⁶	<i>CD95</i> (10) ¹⁴⁷	–	Various MYC alterations (40) ¹⁴⁸ , <i>RAS</i> mutations (40) ¹⁴⁹ , deletion on 13q14 (50) ^{150*}

Les nombres entre parenthèses indiquent le pourcentage de cas connus portant des mutations dans le gène. Les lymphomes pour lesquels aucun événement transformant n'a été identifié ne sont pas répertoriés, de même que les événements transformants qui se produisent dans moins de 5% des cas d'un type de lymphome. Les nombres en exposant correspondent aux numéros des références bibliographiques de la revue de R. Küppers dont est extrait ce tableau (Küppers, 2005).

2. LES CARACTERISTIQUES DES CELLULES MALIGNES

2.1. L'origine cellulaire des lymphomes B

Chaque stade du développement de la cellule B d'une part est caractérisé par une structure particulière du BCR et un profil spécifique d'expression des marqueurs de différenciation, d'autre part a lieu dans des structures histologiques spécialisées. L'analyse de ces caractères fournit des informations sur l'origine cellulaire d'un lymphome (**Tableau 1**). Toute cellule tumorale a une contrepartie normale. Les cellules tumorales semblent bloquées à un stade particulier de différenciation, qui reflète leur origine. Néanmoins, dans certains lymphomes, les cellules tumorales présentent une gamme de différenciation, allant des cellules de centre germinatif aux plasmocytes : le blocage de la différenciation n'est donc parfois pas total. De plus, très souvent, les translocations oncogéniques se produisent à un stade précoce du développement B, au-delà duquel la cellule transformée continue à se différencier et s'arrête à un stade tardif de différenciation. La plupart des lymphomes B dérivent de cellules du centre germinatif ou de cellules post-centre germinatif (Küppers, 2005 ; Shaffer et *al.*, 2002) (**Figure 10**).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'arrêt du développement des cellules malignes dans de nombreuses tumeurs lymphoïdes (Shaffer et *al.*, 2002) :

- des interférences entre l'altération oncogénique et la signalisation régulatrice qui contrôle le développement et la différenciation B ;
- la perte de la capacité de réponse à des stimuli externes, comme l'antigène ou les signaux émis par les cellules environnantes ;
- l'activation de voies de signalisation qui conditionnent la cellule dans un stade de maturation normal particulier.

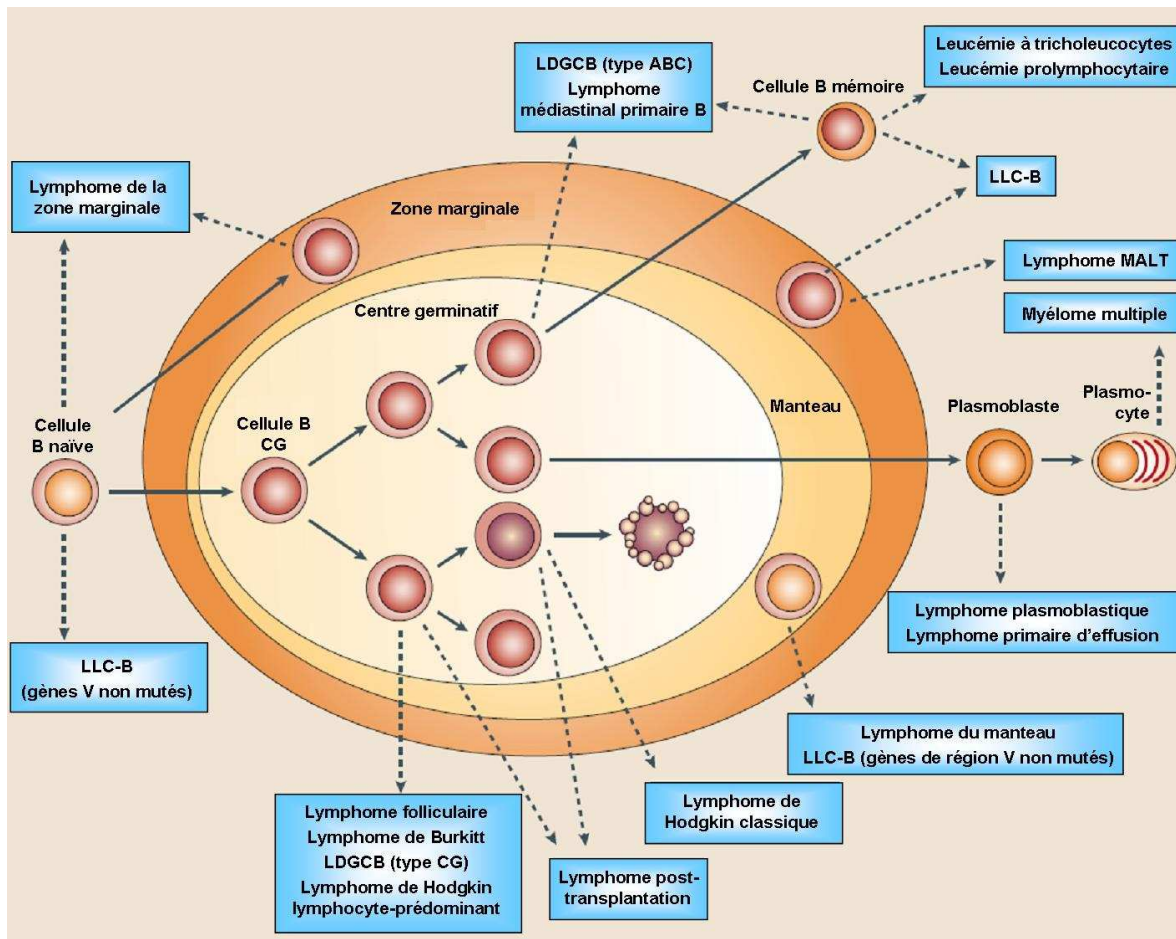


Figure 10. L'origine cellulaire des lymphomes B.

Les lymphomes B sont désignés d'après la contrepartie normale et saine des cellules cancéreuses. La plus grande partie des lymphomes dérivent du centre germinatif ou de cellules qui ont subi la réaction du centre germinatif. Ce dernier jouerait donc un rôle important dans la lymphopathogénèse. Les flèches continues décrivent les étapes de la maturation normale des cellules lors de leur cheminement dans le centre germinatif. Les flèches en pointillé désignent les lymphomes et sont initiées à partir de la cellule saine correspondante. D'après Küppers, 2005.

2.2. Les lésions oncogéniques lors des lymphomes

Les transformations oncogéniques qui se produisent lors des lymphomes B perturbent sévèrement l'homéostasie cellulaire B de trois façons. Elles peuvent :

- favoriser la croissance cellulaire et la prolifération. De nombreux gènes impliqués dans ces phénomènes sont des cibles de *c-myc*. Or, l'expression de *c-myc* est augmentée dans plusieurs lymphomes dérivés de cellules des centres germinatifs, comme le lymphome de Burkitt et certains lymphomes B diffus à grandes cellules. La surexpression de *c-myc* promeut la croissance et la prolifération ;
- inhiber l'apoptose. Les cellules des centres germinatifs sont destinées à l'apoptose sauf si elles sont sauvées par la sélection positive par l'antigène. Plusieurs stratégies sont employées par les cellules malignes pour échapper à l'apoptose, par exemple la surexpression de *Bcl-2* (lymphome folliculaire, certains lymphomes B diffus à grandes cellules) ou l'activation de la

voie NF- κ B (certains lymphomes B diffus à grandes cellules, lymphome de Hodgkin, lymphomes des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses [MALT]...);

- bloquer la différenciation. Par exemple, Bcl-6 est un régulateur transcriptionnel de la prolifération et de la différenciation des cellules B du centre germinatif. Il réprime des gènes impliqués dans l'activation B, l'inflammation et la différenciation terminale. En particulier, il inhibe *Blimp-1*, qui induit la différenciation plasmocytaire. Bcl-6 réprime aussi *p27* et favorise la prolifération des cellules du centre germinatif. Dans les lymphomes non hodgkiniens, *Bcl-6* est fréquemment dérégulé par des translocations chromosomiques, éventuellement suivies d'une hypermutation somatique dans sa région régulatrice 5'. La dérégulation de *Bcl-6* bloquerait les cellules B au stade du centre germinatif. Elles acquerraient ensuite des mutations oncogéniques secondaires, probablement à la suite d'erreurs de l'hypermutation somatique ou de la commutation de classe, qui seraient sélectionnées pour la transformation maligne (pour revues : Lenz et Staudt, 2010 ; Shaffer et *al.*, 2002).

2.3. Le rôle du BCR

L'expression et la fonctionnalité du BCR sont des déterminants importants de la survie des cellules B normales. La sélection pour l'expression du BCR semble également s'appliquer aux cellules B tumorales. En effet, la plupart des cellules de lymphomes B expriment un BCR. Par ailleurs, à de rares exceptions près, les translocations dans les loci d'immunoglobuline impliquent l'allèle non productif. L'allèle exprimé n'étant jamais inactivé par les événements de translocation, il a été suggéré que l'incapacité de produire et d'exprimer un BCR serait incompatible avec la survie de la cellule et son évolution en tumeur. Par ailleurs, lors de l'expansion du clone tumoral, dans de nombreux types de lymphomes, le gène codant la région variable de l'immunoglobuline subit des mutations somatiques. A l'instar des cellules B normales, les cellules B cancéreuses recevraient donc des signaux de survie fournis par le BCR, qui favoriseraient leur maintien.

Il peut arriver néanmoins que certains cas de lymphomes B n'expriment pas le BCR, par exemple des cas de lymphome de Hodgkin classique ou de lymphome post-transplantation. Les cellules tumorales peuvent dériver de cellules B pré-apoptotiques du centre germinatif qui ont perdu l'expression d'un BCR de haute affinité. Plus précisément, ces cellules sont souvent infectées par l'EBV et expriment une protéine virale, LMP2A (*latent membrane protein 2A*), qui peut se substituer aux signaux émis par le BCR et sauver les cellules de l'apoptose. Le lymphome primaire d'effusion peut, rarement, se caractériser par une expression très faible, voire indétectable, du BCR. Elle serait compatible avec une différenciation plasmoblastique (pour revue, Küppers, 2005).

2.4. L'activation antigénique des lymphomes B

Les cellules de lymphome sont capables de reconnaître des antigènes, et la stimulation antigénique contribue à leur survie et à leur prolifération. Il peut s'agir d'auto-antigènes ou d'antigènes étrangers. Des ensembles de leucémie lymphoïde chronique B ont pu être identifiés sur la base de réarrangements géniques V_H et V_L identiques au sein d'un même groupe, ce qui suggère une sélection et une activation par un groupe limité d'épitopes antigéniques. Dans les lymphomes MALT gastriques, l'antigène exerce un rôle indirect sur l'activation des cellules tumorales. En effet, *Helicobacter pylori* est reconnue non pas par les cellules B cancéreuses, mais par les cellules T auxiliaires qui stimulent la prolifération des cellules tumorales. Un traitement antibiotique permet de faire régresser le cancer. En outre, des auto-antigènes peuvent aussi contribuer au développement des lymphomes MALT (pour revues : Küppers, 2005 ; Schaffer et *al.*, 2002).

2.5. Le rôle du microenvironnement tumoral

Dans de nombreux lymphomes, le microenvironnement tumoral semble capital pour la survie et la prolifération des cellules malignes. Par exemple, des cellules de lymphome folliculaire ne peuvent proliférer *in vitro* qu'en présence de cellules T $CD4^+$, ou de cellules stromales du centre germinatif et d'un anticorps dirigé contre CD40. De plus, dans le lymphome folliculaire, les cellules malignes sont concentrées et prolifèrent dans des structures folliculaires, en association avec les lymphocytes T auxiliaires et les cellules dendritiques folliculaires. Des cellules tumorales peuvent aussi se localiser dans les zones interfolliculaires, mais elles ont des capacités prolifératives réduites (pour revue, Küppers, 2005).

3. L'ORIGINE ET LES MECANISMES DES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES

Les translocations (**Figure 11**) sont les mutations les plus fréquemment rencontrées dans les tumeurs lymphoïdes. Elles peuvent fournir à la cellule un avantage prolifératif ou de survie :

- d'une part en juxtaposant un oncogène à des éléments *cis*-régulateurs transcriptionnels qui vont déréguler son expression. C'est le cas du lymphome de Burkitt, au cours duquel *c-myc* est transloqué dans le locus *IgH* ;

- d'autre part en fusionnant deux gènes qui produiront une protéine chimérique à activité oncogénique. C'est le cas de la leucémie lymphoblastique et de la leucémie myéloïde chronique, caractérisées par le chromosome Philadelphie⁴.

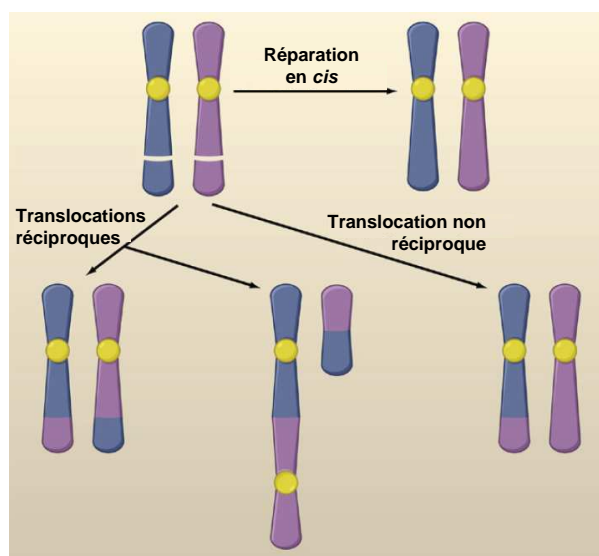


Figure 11. Une mauvaise réparation des cassures d'ADN provoque des translocations.

Les translocations chromosomiques nécessitent la formation de cassures d'ADN double brin simultanément sur différents chromosomes. Elles peuvent alors être réparées *in cis*, ou induire des translocations à la suite du réarrangement entre deux chromosomes non homologues. Selon la topologie du réarrangement, la translocation peut être réciproque (équilibrée ou déséquilibrée) ou non réciproque. Les translocations impliquées dans la majorité des lymphomes sont des translocations réciproques équilibrées. D'après Nussenzweig et Nussenzweig, 2010.

Une translocation nécessite la formation de cassures double brin de l'ADN sur des chromosomes différents, la mise à proximité des extrémités et la jonction des extrémités d'ADN hétérologues. Les cellules B sont particulièrement sensibles à la transformation par translocation car elles sont sujettes à des phénomènes de diversification du répertoire antigénique de leur récepteur au cours des recombinaisons V(D)J, de l'hypermutation somatique et de la commutation de classe, qui génèrent des dommages programmés à l'ADN (pour revue : Nussenzweig et Nussenzweig, 2010) (Figure 11).

3.1. Le rôle des recombinaisons et des facteurs de réparation

Les recombinaisons RAG1 et RAG2 sont impliquées dans les recombinaisons V(D)J. Elles provoquent donc des cassures de l'ADN au niveau des loci d'immunoglobuline durant le développement B. Elles pourraient également induire des cassures au niveau des oncogènes, comme *Bcl-2*, comme cela a été montré *in vitro* (Raghavan et al., 2004 ; Tsai et al., 2008).

⁴ Le chromosome Philadelphie est le dérivé du chromosome 22 après la translocation t(9;22) qui juxtapose le gène *Abl-1* sur le chromosome 22 au gène *BCR* (*breakpoint cluster region*) issu du chromosome 9 (Nowell et Hungerford, 1960, 1961).

Contexte bibliographique

On distingue classiquement deux types de translocations RAG-dépendantes, en fonction du mécanisme à l'origine de la cassure dans le locus non immunoglobuline. Tout d'abord, les RAG seraient capables de reconnaître, de lier et de cliver des séquences divergentes par rapport aux SSR consensus : ces sites sont qualifiés de « cryptiques ». Cette capacité est la contrepartie pernicieuse de la flexibilité des RAG, essentielle pour leur permettre de reconnaître et de couper, « physiologiquement », des SSR parfois polymorphes autour des segments géniques d'immunoglobuline. Les sites cryptiques sont très répandus dans le génome, à une densité d'un tous les 0,6 à 2 kb (selon les méthodes de calcul). L'accessibilité de ces sites potentiels pour les RAG serait finement régulée par des changements de la structure chromatinienne (la compaction de la chromatine inhibe le clivage des SSR par les RAG). Dans la première catégorie de translocations (type 1), une recombinaison V(D)J illégitime se produit entre un segment génique légitime d'un locus d'immunoglobuline et le locus illégitime d'un oncogène possédant une SSR cryptique (pour revues : Jankovic et *al.*, 2007 ; Lieber et *al.*, 2006 ; Marculescu et *al.*, 2006).

Dans les translocations de type 2, seule la cassure au locus d'immunoglobuline est réalisée par recombinaison V(D)J. La cassure au niveau du locus de l'oncogène est créée par d'autres mécanismes (*cf. infra*) et envahirait ensuite le complexe synaptique V(D)J pendant le processus de réarrangement. Les translocations de type 2 impliquent trois partenaires : un oncogène et deux segments géniques. Elles surviendraient au cours d'une tentative de réarrangement entre deux partenaires légitimes de recombinaison V(D)J, mais la présence fortuite d'une troisième extrémité d'ADN (correspondant au locus de l'oncogène) parasiterait la jonction physiologique. Elles résulteraient donc d'une réparation illégitime de l'extrémité de l'oncogène avec des produits intermédiaires de recombinaison V(D)J. Deux phénomènes pourraient expliquer les translocations de type 2 : une extrémité codante pourrait s'échapper du complexe synaptique. Alternativement, les bouts cassés au niveau de l'oncogène pourraient envahir (ou être recrutés dans) le complexe synaptique et former ainsi une synapse tripartite regroupant les six extrémités d'ADN. Leur présence simultanée favoriserait différentes combinaisons de jonction des extrémités : en particulier, une extrémité du locus de l'oncogène serait reliée à une extrémité signal tandis que l'autre extrémité du locus de l'oncogène serait fusionnée à une extrémité codante. Au niveau des points de cassure des translocations de type 2, des additions *de novo* de nucléotides, appelés nucléotides T (*templated nucleotides*), sont présentes. Ces insertions ne correspondent pas à des additions aléatoires de nucléotides, comme pour les nucléotides N, mais ressemblent fortement à des copies de séquences adjacentes dans le locus d'immunoglobuline ou de l'oncogène. Dans le complexe synaptique, l'une des extrémités libérées peut être allongée en utilisant comme matrice la séquence d'une autre extrémité, par un processus de synthèse d'ADN matrice-dépendante prédisposée aux erreurs. Cette

extrémité modifiée est ensuite raboutée à un autre point de cassure, et donne lieu à la translocation (pour revues : Lieber et *al.*, 2006 ; Marculescu et *al.*, 2006).

Certains sites dans le génome, notamment dans le locus de certains oncogènes, ne fonctionnent pas comme des SSR mais sont pourtant clivés par les RAG. Ils peuvent adopter une conformation d'ADN non B, caractérisée par de fréquentes régions d'ADN simple brin. Par exemple, c'est le cas du locus *Bcl-2*, au niveau de la région majeure de points de cassure. Les régions simple brin pourraient interagir et induire un changement de conformation de l'ADN et une courbure de la région intermédiaire (qui pourraient être amplifiés par la liaison d'autres protéines). Or, les RAG sont des endonucléases structure-spécifiques (Raghavan et *al.*, 2004). Les RAG peuvent aussi produire des cassures à de multiples endroits d'une région double brin adoptant des structures d'ADN non B, comme des « bulles symétriques » ou des « boucles hétérologues », indépendamment de la séquence (Raghavan et *al.*, 2005b, 2007). Les régions simple brin au niveau des régions de points de cassure du locus *Bcl-2* pourraient aussi favoriser une organisation de ces régions en triplex d'ADN, qui semble déterminante dans la formation des cassures et la survenue des translocations de *Bcl-2* (Raghavan et *al.*, 2005a). Les sites de clivage par les RAG se trouvent généralement à la jonction du duplex d'ADN avec la zone en configuration non B. Les RAG créent des cassures double brin en formant deux coupures simples brin indépendantes : ces coupures sont normalement religaturées par les systèmes de réparation, mais elles dégènèrent en cassures double brin si elles sont suffisamment proches sur les deux brins (Raghavan et *al.*, 2005b). Une caractéristique de certains points chauds de cassures dans les loci *Bcl-2*, *cycline D1* et *E2A* est la présence de sites CpG. Chez les vertébrés, la cytosine du dinucléotide CpG est fréquemment méthylée en position C5. La déamination spontanée de la 5-méthylcytosine forme une thymine et provoque un mésappariement T:G. Ce site est ensuite ciblé, intercepté, par les RAG et converti en une cassure double brin, avant ou pendant la tentative de réparation. Les deux extrémités d'ADN formées peuvent ensuite fusionner avec les extrémités produites lors du processus de recombinaison V(D)J. La déamination des cytosines non méthylées donne des mésappariements U:G, moins persistants et réparés de façon adéquate (Tsai et *al.*, 2008). Après les cassures générées par les RAG, le système NHEJ prendrait en charge la jonction des extrémités lors du processus de translocation (pour revues : Jankovic et *al.*, 2007 ; Lieber et *al.*, 2006).

Face au danger potentiel des RAG, il existe plusieurs niveaux de sécurité qui limitent l'instabilité génétique (Raghavan et *al.*, 2007) :

- les RAG ne sont exprimées que dans les cellules B (et T) précoces : seules ces cellules sont menacées ;

Contexte bibliographique

- la protéine RAG2 n'est stable qu'en phase G0/G1 du cycle cellulaire, bloquant l'activité recombinase durant la réplication de l'ADN lorsque les jonctions double brin / simple brin sont fréquentes ;
- une coupure isolée est religaturée par l'ADN ligase I (seules deux coupures proches sont dangereuses).

3.2. Le rôle d'AID

Les enzymes AID et UNG induisent des lésions dans le locus *IgH* lors de l'hypermutation somatique et de la commutation de classe. En outre, elles seraient aussi impliquées dans les translocations chromosomiques joignant des oncogènes, comme *c-myc*, au locus *IgH* associées à ces processus (Janz, 2006). Les lésions créées par AID dans le locus *IgH*, aussi bien au niveau des régions variables que des régions S, et leur résolution favorisent donc les translocations *c-myc-IgH*, et promeuvent la transformation (Dorsett et al., 2007 ; Ramiro et al., 2004, 2006). L'expression d'AID peut être induite par le LPS ou par des infections par certains virus transformants (hépatite C, virus murin de leucémie d'Abelson, EBV). Par exemple, AID induite par l'EBV provoque des cassures double brin qui serviraient de substrats pour les translocations *c-myc-IgH* associées au lymphome de Burkitt (Ramiro et al., 2004). AID est impliquée dans la lymphomagenèse affectant des cellules du centre germinatif ou post-centre germinatif, mais n'a aucun impact sur le développement de lymphomes pré-centre germinatif. L'inhibition d'AID empêche l'induction de translocations (Pasqualucci et al., 2008). Le groupe de M. C. Nussenzweig a été le premier à montrer directement que l'expression dérégulée d'AID provoquait des lymphomes B matures : surexprimée chez la souris, AID provoque des cassures double brin sur la plupart des chromosomes, et l'expression d'AID peut expliquer la survenue de lésions chromosomiques qui aboutissent à divers lymphomes (Robbiani et al., 2009).

La responsabilité d'AID dans la genèse de cassures double brin dans les loci autres que ceux des gènes d'immunoglobuline est nettement moins renseignée. Dans le cas de la translocation *c-myc-IgH*, AID est essentielle pour réaliser les cassures aux deux loci. Au niveau du locus de l'oncogène *c-myc*, la région promotrice est nécessaire pour induire les translocations. En effet, la transcription du locus favorise son ciblage par AID : elle permet d'exposer des régions d'ADN simple brin qui sont des substrats pour AID. Néanmoins, les mécanismes qui permettent au processus de transcription de cibler AID vers un gène ne sont pas encore élucidés. AID induit des lésions et des mutations dans *c-myc* et ces lésions sont à l'origine de translocations *c-myc-IgH* (Robbiani et al., 2008). Les cassures générées dans *c-myc* sont moins fréquentes que les cassures du locus *IgH* et limitent la

survenue des translocations (Robbiani et *al.*, 2008 ; Wang et *al.*, 2009). *c-myc* n'est pas le seul gène « non immunoglobuline » impliqué dans des translocations avec les loci d'immunoglobuline. En 2010, l'équipe de Nussenzweig a identifiée le gène *Igβ* comme cible d'AID et substrat de translocations au locus *IgH* (Jankovic et *al.*, 2010). AID est capable de provoquer des cassures d'ADN sur la plupart des chromosomes et d'impliquer une grande variété de gènes dans les translocations (Robbiani et *al.*, 2009). Les nombreux gènes soumis à des mutations somatiques AID-dépendantes subiraient aussi des cassures d'ADN qui constitueraient des substrats pour les translocations.

Dans les tumeurs de cellules du centre germinatif ou post-centre germinatif, auxquelles contribue AID, la fonction de celle-ci ne semble pas anormale. Le gène *AICDA* est intact et son expression, dans la plupart des tumeurs, n'est pas supérieure à celle des cellules normales de centre germinatif. Un défaut des mécanismes qui guident AID vers ses cibles pourrait expliquer les lésions génétiques observées dans les lymphomes B matures non hodgkiniens. Les lésions oncogéniques qui bloquent la différenciation B pourraient prolonger anormalement l'activité d'AID dans un environnement cellulaire où la réponse aux stress génotoxiques est altérée (par exemple à cause de l'abrogation Bcl-6-dépendante de la réponse aux dommages à l'ADN) (Pasqualucci et *al.*, 2008).

3.3. L'action combinée des RAG et d'AID

Les recombinaisons RAG1/2 et AID sont exprimées à des stades de développement B différents. Les cassures produites par les RAG peuvent cependant persister, en particulier lorsque la kinase ATM (régulateur essentiel du point de contrôle des dommages à l'ADN, *cf. infra*) est absente ou défaillante. Dans les cellules qui ne peuvent plus répondre à ce point de contrôle, des cassures d'ADN générées au niveau du locus *IgH* par les RAG au stade pré-B sont maintenues sans altérer les étapes ultérieures du développement B, jusqu'au stade B mature dans les organes lymphoïdes périphériques. Là, elles pourront s'associer à des cassures générées par AID, par exemple lors de la commutation de classe (Callén et *al.*, 2007). Ces observations ont fait naître le concept d'instabilité génomique retardée. Une cassure double brin persistante peut s'éloigner de sa position d'origine et occuper des territoires chromosomiques différents dans le noyau. Si elle est transmise lors des divisions cellulaires, elle pourra ultérieurement être impliquée dans une translocation avec un chromosome qui aura subi une cassure dans les cellules descendantes. Cette forme retardée d'instabilité génomique contribuerait à la transformation des lymphocytes matures. Au contraire, les modèles proposés auparavant supposaient que les cassures sur les deux partenaires chromosomiques se produisaient au même moment et dans la même cellule (Callén et *al.*, 2007). Le rôle de la

Contexte bibliographique

signalisation par ATM et p53 dans le maintien de l'intégrité du génome lors des événements survenant au cours du développement des cellules B est abordé dans la partie de ce mémoire traitant de p53.

Des translocations par jonctions de cassures induites par RAG avec des cassures induites par AID sont observées dans des cellules B périphériques n'exprimant pas p53 ni le facteur de NHEJ XRCC4. Ces cellules sont engagées dans l'édition du BCR par des tentatives de réarrangements secondaires au locus de chaîne légère *Igλ* et dans la commutation de classe (qui cible le locus *IgH*). Par ailleurs, elles donnent naissance à des lymphomes B qui présentent des translocation *c-myc-IgH* et des translocations entre les régions variables *Igλ* et les régions S *IgH* (Wang et *al.*, 2008, 2009). En l'absence de XRCC4, les recombinaisons V(D)J et la commutation de classe sont profondément altérées, et une voie alternative de jonction des extrémités joint les cassures RAG-dépendantes du locus *Igλ* aux cassures AID-dépendantes du locus *IgH*. Cette voie alternative prédispose les cellules aux translocations. La réparation anormale ou retardée des cassures induites par RAG permettrait leur coexistence avec les lésions induites par AID : les RAG et AID peuvent donc coopérer pour produire les translocations *IgH-Igλ* qui caractérisent les tumeurs. Notons que ces translocations, contrairement aux translocations *c-myc-IgH*, ne fournissent pas d'avantage sélectif aux cellules, mais reflètent simplement l'action de facteurs mécaniques qui impliquent deux loci sujets à des cassures double brin et spatialement proches (Wang et *al.*, 2009).

La collaboration RAG/AID s'applique à un autre niveau. AID pourrait également potentialiser le rôle des RAG dans la formation des cassures double brin. Au cours des stades précoces du développement B, dans la moelle osseuse, AID serait exprimée à un niveau relativement limité mais suffisant pour favoriser l'apparition de mésappariements U:G. Ceux-ci déterminent une structure d'ADN non B qui sert de substrat pour les RAG. C'est par exemple le cas au niveau des gènes *Bcl-2*, *cycline D1* et *E2A* (Tsai et *al.*, 2008).

3.4. L'implication des mécanismes de réparation

Les mécanismes de réparation fidèle et efficace des cassures d'ADN double brin sont importants pour maintenir l'intégrité du génome. Deux principales voies de signalisation assurent la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes : la NHEJ (pour revues, Lieber et *al.*, 2010a, 2010b) et la recombinaison homologue (pour revue, Holthausen et *al.*, 2010) (**Figure 12**). La NHEJ est particulièrement importante en phases G0/G1 du cycle cellulaire, quand les chromatides sœurs ne sont pas disponibles pour la recombinaison homologue. La NHEJ est impliquée dans les

recombinaisons V(D)J, la commutation de classe et les translocations chromosomiques associées aux processus de diversification du répertoire antigénique. Si l'absence d'un facteur clef de la NHEJ abolit la résolution des extrémités lors de la recombinaison V(D)J, l'effet est beaucoup moins drastique lors de la commutation de classe. Dans ce cas, une voie alternative de jonction des extrémités (A-NHEJ) peut effectivement fonctionner en l'absence de Ku70/80, Lig4 et XRCC4 et assurer la commutation à 50% d'efficacité (pour revues : Jankovic et *al.*, 2007 ; Nussenzweig et Nussenzweig, 2010 ; Weinstock et *al.*, 2006).

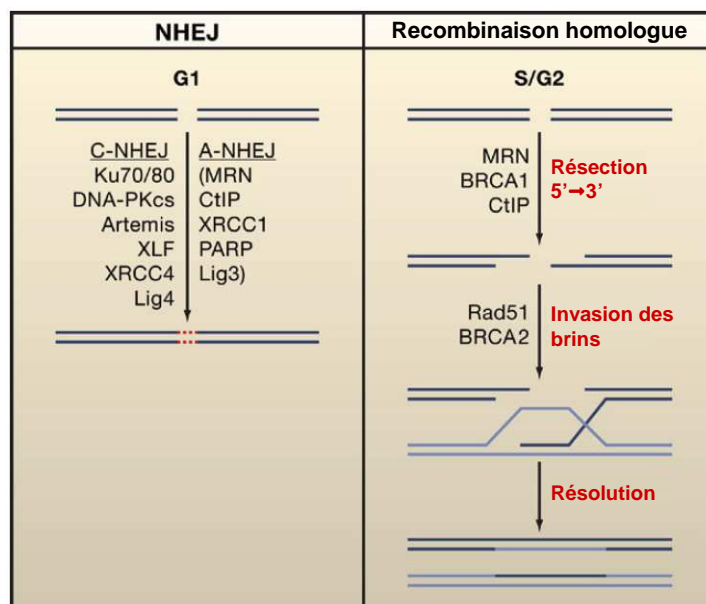


Figure 12. La réparation des cassures d'ADN double brin.

Les deux principaux mécanismes de réparation des cassures d'ADN double brin sont la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue. Au cours de la NHEJ, les extrémités d'ADN sont reconnues par le complexe Ku et DNA-PKcs. Une voie alternative peut être utilisée (voir chapitre 1, et pour revues, Lieber et *al.*, 2010a, 2010b). La recombinaison homologue agit en utilisant une copie intacte du chromosome cassé comme matrice. Elle est induite par la résection 5'-3' des cassures double brin pour former une région d'ADN simple brin. Le brin simple d'ADN envahit ensuite la chromatide sœur intacte. Après synthèse d'ADN, les extrémités sont jointes, aboutissant à des produits intacts (pour revue, Holthausen et *al.*, 2010). D'après Nussenzweig et Nussenzweig, 2010.

A la différence de la NHEJ, la recombinaison homologue utilise une séquence matrice pour la réparation des cassures et, à ce titre, est une voie précise, non mutagène, de réparation (**Figure 12**). Lors de la recombinaison homologue, les événements de *crossing-over* sont très rares. De plus, la recombinaison homologue entre chromosomes homologues est cinq à dix fois plus fréquente qu'entre deux chromosomes hétérologues. Cependant, même si un *crossing-over* entre chromosomes homologues ne provoque pas de translocation, il peut aboutir à une perte d'hétérozygotie, ce qui est tout aussi délétère pour la cellule. Par ailleurs, la recombinaison homologue se produit majoritairement entre deux chromatides sœurs, plutôt qu'entre chromosomes homologues ou hétérologues. La suppression des *crossing-over* est une caractéristique générale de la recombinaison homologue. En outre, la recombinaison homologue est fortement inhibée par les divergences de séquences. De ce fait, très rares sont les translocations provoquées par la recombinaison

Contexte bibliographique

homologue : les réarrangements génomiques sont plutôt réalisés par la NHEJ (pour revues : Nussenzweig et Nussenzweig, 2010 ; Weinstock et *al.*, 2006).

Les protéines essentielles (Ku70, Ku80, XRCC4 et Lig4) de la voie NHEJ classique (C-NHEJ) jouent un rôle capital dans les jonctions intrachromosomiques lors des recombinaisons V(D)J. Pourtant, elles ont plutôt un rôle suppresseur que promoteur des jonctions aberrantes qui interviennent lors des translocations chromosomiques. C'est l'absence des facteurs de la C-NHEJ qui favorise les jonctions anormales associées aux translocations, en augmentant la quantité de cassures d'ADN double brin, substrats pour les translocations, du fait d'une réparation inefficace *in vivo*. En effet, les translocations induites par les RAG ou par AID ne nécessitent pas l'intervention de Ku70, Ku80, DNA-PKcs ou XRCC4 (pour revue, Nussenzweig et Nussenzweig, 2010). C'est donc essentiellement la voie A-NHEJ qui est particulièrement active et assure la jonction des extrémités dans les translocations chromosomiques, y compris dans les cancers non lymphoïdes. Contrairement à la voie classique qui joint des extrémités franches ou de très courtes séquences homologues (moins de 4 pb), la voie alternative fonctionne dans un contexte de micro-homologie et joint des séquences homologues de 5 à 25 pb. La jonction est précédée par une résection des extrémités pour exposer des séquences d'ADN simple brin homologues qui pourront s'hybrider (Haber, 2008 ; Zha et *al.*, 2009 ; et pour revue, Nussenzweig et Nussenzweig, 2010). Bien que l'A-NHEJ soit utilisée par la cellule lorsque la C-NHEJ n'est pas fonctionnelle, on ne sait pas précisément dans quelle mesure elle est active en conditions physiologiques ni comment s'opère le choix entre ces deux voies.

La détection et la réparation rapides des cassures sont fondamentales pour maintenir la stabilité du génome et prévenir la mort cellulaire ou le cancer. Les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme des cassures double brin comprennent des détecteurs qui reconnaissent les dommages à l'ADN, des transducteurs de signaux qui amplifient les signaux de dommages à l'ADN et des effecteurs qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Jankovic et *al.*, 2007). Différentes protéines de réponse aux dommages à l'ADN (Nbs1, ATM, 53BP1) s'accumulent dans les régions entourant la cassure d'ADN, formant des « foyers » de réparation des dommages à l'ADN. D'autres se fixent directement aux cassures sans s'accumuler dans les régions environnantes, comme les protéines de la NHEJ classique. Pour permettre la formation de tels foyers, l'histone H2AX doit d'abord être phosphorylée, pour assurer l'ancrage et stabiliser la liaison des protéines formant les foyers. Ces phénomènes sont observés lors de la recombinaison V(D)J et de la commutation de classe. De nombreux facteurs impliqués dans la formation des foyers assurent le maintien de la stabilité génomique. En leur absence, la cellule est beaucoup plus sensible aux translocations chromosomiques. En effet, des souris déficientes pour ces facteurs sont prédisposées au cancer. Comme les protéines impliquées dans la NHEJ et la

recombinaison homologue, les protéines formant des foyers ne sont pas impliquées dans les échanges interchromosomiques. En revanche, en leur absence les cassures double brin sont réparées de façon aberrante ou inefficace en G0/G1 : ainsi, davantage de cassures seraient disponibles comme substrat pour les translocations (pour revues : Jankovic et *al.*, 2007 ; Nussenzweig et Nussenzweig, 2010).

3.5. Les autres causes de cassures dans les loci des oncogènes

D'autres facteurs et d'autres processus cellulaires peuvent être à l'origine des cassures au niveau des loci des oncogènes, par exemple *c-myc*. Le locus *c-myc* contient des segments fragiles d'ADN qui adoptent une configuration non B (ADN de forme Z, triplex d'ADN, structures G-quadruplexes). Ces séquences sont particulièrement vulnérables et sont les cibles de cassures et de dommages à l'ADN qui surviennent indépendamment d'AID lors de la transcription ou de la réplication. Elles sont également sensibles à certains agents environnementaux et au stress métabolique. Ces facteurs supplémentaires constituent de nouvelles sources de cassures double brin et rendent le locus *c-myc* enclin aux translocations (Robbiani et *al.*, 2008 ; et pour revue, Reddy et Vasquez, 2005).

3.6. L'importance de la localisation subnucléaire

Dans le noyau, les chromosomes sont répartis entre différents territoires définis selon leur accessibilité et leur activité transcriptionnelle (Lieberman-Aiden et *al.*, 2009). La proximité physique entre les loci transloqués, au sein du même territoire nucléaire, serait un paramètre supplémentaire qui influencerait sur la fréquence des translocations entre les chromosomes. En effet, une juxtaposition préférentielle et récurrente de deux loci favoriserait une translocation et déterminerait la fréquence d'apparition de translocations chromosomiques spécifiques. Les gènes à réponse précoce immédiate (gènes IE, *immediate early*) sont activés transitoirement et rapidement en réponse à une grande variété de stimuli cellulaires. Dans ce cas, ils sont repositionnés dans le noyau au niveau des « usines de transcription ». Cette organisation transcriptionnelle dynamique n'est pas aléatoire et juxtapose fréquemment les loci *c-myc* et *IgH* dans les cellules B, mais pas dans les autres types cellulaires. Comme vu précédemment, ces loci peuvent être le théâtre de création et de réparation de cassures double brin : leur proximité accroît dangereusement le risque d'une résolution aberrante et prédispose alors les loci à un réarrangement inter-chromosomique (Janz, 2006 ; Osborne et *al.*, 2007 ; Wang et *al.*, 2009). Chez la souris, une telle co-localisation semble corrélée à l'apparition de translocations spécifiques lors du plasmocytome (Osborne et *al.*, 2007). Les mécanismes qui

Contexte bibliographique

permettent à plusieurs loci dispersés de se rejoindre ne sont pas encore identifiés. Des loci soumis à la même régulation transcriptionnelle auraient une plus grande probabilité de se rapprocher (Spilianakis et *al.*, 2005). Néanmoins, une transcription active ne semble pas un pré-requis absolu aux translocations, car des translocations *c-myc-IgH* sont observées aussi bien avec un allèle *c-myc* transcriptionnellement actif qu'avec un allèle silencieux (Robbiani et *al.*, 2008).

3.7. L'hypermutation des gènes « non-immunoglobulines »

A la différence des RAG qui sont des endonucléases séquence-spécifiques, AID peut cibler n'importe quelle séquence, avec toutefois une préférence pour les motifs RGYW. Au-delà des gènes d'immunoglobuline, AID peut, en effet, muter de nombreux oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs : *Bcl-6* (Gaidano et *al.*, 1997 ; Pasqualucci et *al.*, 1998 ; Shen et *al.*, 1998 ; Storb et *al.*, 2001), *CD95/Fas* (Müschen et *al.*, 2000), les protéines accessoires du BCR *Ig α* et *Ig β* (Gordon et *al.*, 2003), *c-myc*, *Pim1*, *RhoH/TTF* (de la famille de *Ras*) et *Pax5* (Pasqualucci et *al.*, 2001) (pour revue, Nussenzweig et Nussenzweig, 2010). *Bcl-6*, *Fas*, *Ig α* et *Ig β* peuvent être hypermutés dans les cellules B normales. De plus, *Bcl-6* est muté dans des cas de lymphome B diffus à grandes cellules ou de lymphome folliculaire sur l'allèle non transloqué (Migliazza et *al.*, 1995). Des mutations somatiques dans *Ig α* et *Ig β* ont aussi été détectées dans des lignées de cellules B malignes du centre germinatif ou post-centre germinatif. Les mutations somatiques de *c-myc*, *Pim1*, *RhoH/TTF* et *Pax5* sont associées seulement à un contexte pathologique. Une étude récemment menée sur 118 gènes exprimés dans les lymphocytes B des centres germinatifs a révélé qu'un quart à un tiers était muté par AID (Liu et *al.*, 2008). Dans certains cas, l'hypermutation résulte de la translocation et est liée à la juxtaposition de l'oncogène aux gènes d'immunoglobuline, par exemple pour *c-myc* lors du lymphome de Burkitt (Rabbitts et *al.*, 1983, et *cf. infra*), dans d'autres, elle semble indépendante des phénomènes de translocation (Migliazza et *al.*, 1995 ; Pasqualucci et *al.*, 2001). Malgré tout, bien qu'étant physiologiquement fortement exprimés, certains gènes ne deviennent pas pour autant des cibles de l'hypermutation somatique. Par exemple, *S14* (gène codant la protéine 14 de la petite sous-unité ribosomale) et *c-myc* ne sont pas mutés dans les cellules normales, contrairement à *Bcl-6* (Shen et *al.*, 1998 ; Storb et *al.*, 2001). Les mutations des oncogènes pourraient fournir aux cellules tumorales un avantage sélectif. Ainsi, lors de la réaction dans le centre germinatif, les mutations somatiques du gène *Fas* conféreraient à la cellule la résistance à l'apoptose et de ce fait contrediraient la sélection négative réalisée par la voie *Fas*-dépendante (Müschen et *al.*, 2000). Les mutations de *Ig α* et *Ig β* contribueraient à la survie des cellules B en limitant la signalisation par le BCR (Gordon et *al.*, 2003).

Deux cas de figure peuvent se présenter lorsque des oncogènes transloqués contiennent des mutations somatiques, du point de vue de l'étiologie du lymphome. D'une part, l'hypermutation peut être consécutive à la translocation oncogénique, à cause du rapprochement de l'oncogène des régions régulatrices d'un locus d'immunoglobuline, qui induit le recrutement et l'action d'AID. Alternativement, avant d'être transloqué, l'oncogène peut être la cible d'AID : celle-ci agit alors au niveau du locus de l'oncogène, le fragilise et le prédispose aux cassures d'ADN. Il pourra ensuite se recombiner avec un locus d'immunoglobuline. Dans ce dernier cas, l'hypermutation est antérieure à la translocation (voir plus haut le paragraphe 3.2 « *Le rôle d'AID* », sur la contribution d'AID à la réalisation des translocations, notamment les translocations *c-myc-IgH*, les mieux renseignées).

L'hypermutation somatique peut donc intervenir en dehors des loci d'immunoglobulines : AID agit sur une grande diversité de gènes transcrits dans le génome (Liu et *al.*, 2008). Cependant, la fréquence de mutations dans les gènes « non-immunoglobulines » est nettement plus faible que dans les loci d'immunoglobuline (Liu et *al.*, 2008 ; Pasqualucci et *al.*, 1998). De nombreux gènes répartis tout au long du génome sont ciblés par AID dans les cellules B normales des centres germinatifs, mais des mécanismes de réparation à haute fidélité protègent les cellules de l'accumulation de mutations (Liu et *al.*, 2008). Par ailleurs, la façon dont AID discrimine ses cibles et évite de générer des dommages de l'ADN très répandus n'est pas encore élucidée (Nussenzweig et Nussenzweig, 2010).

Les mutations somatiques du gène *c-myc* transloqué lors des lymphomes

Dans le lymphome de Burkitt et d'autres lymphomes agressifs, au cours desquels *c-myc* est transloqué dans l'un des loci d'immunoglobuline, l'allèle *c-myc* transloqué est la cible de phénomènes de mutations somatiques, mis en évidence à partir de lignées cellulaires de lymphome de Burkitt ou de biopsies tumorales (Bemark et Neuberger, 2000 ; Bhatia et *al.*, 1993 ; Cesarman et *al.*, 1987 ; Clark et *al.*, 1994 ; Johnston et *al.*, 1991 ; Johnston et Carroll, 1992 ; Müller et *al.*, 1995 ; Rabbitts et *al.*, 1983, 1984 ; Taub et *al.*, 1984 ; Yano et *al.*, 1993). Ces mutations peuvent avoir lieu dans les régions régulatrices de *c-myc* (exon 1 non codant, séquences adjacentes 5' et intron 1) ou dans les exons codants. Les mutations dans la région régulatrice compromettent la régulation normale de l'expression de *c-myc* et les mutations dans les exons 2 ou 3 (codants) affectent la fonction biologique de *c-myc* (dimérisation, spécificité du substrat...) ou la demi-vie de l'ARNm (Johnston et *al.*, 1991). L'allèle sauvage resté dans sa configuration endogène est silencieux et n'accumule pas de mutations (Bemark et Neuberger, 2000 ; Johnston et *al.*, 1991 ; Taub et *al.*, 1984). L'hypermutation de *c-myc* résulterait de l'influence du locus d'immunoglobuline juxtaposé. En effet, la translocation de *c-myc* dans le locus *IgH* et son positionnement en amont des segments de région constante à la

Contexte bibliographique

place du segment VDJ en feraient un substrat pour l'hypermutation somatique, qui cible l'exon VDJ au cours du développement B normal, lors de la maturation d'affinité du BCR. Le profil des mutations de *c-myc* présente les caractéristiques de l'hypermutation somatique : substitutions nucléotidiques avec une prédominance de transitions sur les transversions, ciblage préférentiel des résidus C ou G avec une forte proportion dans le triplet AGC (Bemark et Neuberger, 2000).

L'hypermutabilité de *c-myc* transloqué contribue-t-elle à la lymphomagenèse, ou est-ce la translocation chromosomique qui seule dérégule la transcription de *c-myc*, la mutabilité n'étant alors qu'une conséquence de la translocation ? Selon certains auteurs, les mutations somatiques de *c-myc* contribueraient pleinement à l'oncogenèse, essentiellement celles qui touchent la région régulatrice (Rabbitts et *al.*, 1983). D'autres ont conclu, en l'absence de mutations consensus dans les domaines codant la protéine, que les mutations dans ces régions ne conféraient pas à *c-myc* un potentiel transformant plus grand et avantageux face à la pression de sélection de la cellule tumorale (Johnston et *al.*, 1991). En revanche, d'autres études suggèrent clairement un rôle pathogène des mutations dans la région codante de *c-myc*, dû à l'altération des interactions entre les domaines fonctionnels de la protéine et d'autres facteurs cellulaires (Albert et *al.*, 1994 ; Axelson et *al.*, 1995 ; Bhatia et *al.*, 1993 ; Clark et *al.*, 1994 ; Yano et *al.*, 1993). Dans leur étude, M. Bemark et M. Neuberger ne constatent pas d'avantage prolifératif fourni aux cellules tumorales par les mutations qu'ils observent et déduisent qu'elles ne favoriseraient pas l'oncogenèse. Néanmoins, ils n'excluent pas que des mutations de *c-myc* ailleurs que dans la région qu'ils ont analysées (région commençant en amont du promoteur et allant jusqu'au début de l'intron 1), ou même les mutations d'autres oncogènes également transloqués dans les loci d'immunoglobuline, puissent contribuer à la lymphomagenèse et accentuer le phénotype malin (Bemark et Neuberger, 2000). Par ailleurs, deux équipes ont montré que des mutations touchant la région codante de *c-myc*, au niveau de la zone MBI dans la partie N-terminale, dans de nombreuses lignées de lymphome de Burkitt, rendaient la protéine réfractaire à la dégradation dépendante du système ubiquitine-protéasome. Par conséquent, la protéine *c-myc* mutante est stabilisée, ce qui augmenterait son activité transformante et favoriserait la prolifération incontrôlée des cellules de lymphome de Burkitt. La dérégulation de la protéolyse de *c-myc* serait donc un mécanisme alternatif, ou additionnel, d'activation oncogénique. Les mutations de *c-myc* dans les exons codants peuvent donc également contribuer à la lymphomagenèse. Le développement du lymphome de Burkitt impliquerait l'activation de *c-myc* en deux étapes successives : d'une part la dérégulation de l'expression par la translocation dans le locus d'immunoglobuline, d'autre part la mutation de sites régulateurs importants aboutissant au contournement du cycle de renouvellement par le système ubiquitine-protéasome et à l'accumulation de *c-myc* (Bahram et *al.*, 2000 ; Gregory et Hann, 2000). La translocation aboutit à l'expression constitutive, mais pas obligatoirement élevée, de *c-myc*. Ainsi, la stabilisation et la persistance de la

protéine, dues à des mutations qui touchent aussi bien les régions régulatrices de *c-myc* que les régions codantes, permettent ensuite d'induire une expression constitutive de *c-myc* à un taux élevé dans le lymphome. Les mutations somatiques du gène *c-myc* transloqué ne sont toutefois pas une caractéristique universelle du lymphome de Burkitt ou des lymphomes portant la translocation de *c-myc* dans un locus d'immunoglobuline (Axelson et *al.*, 1995 ; Johnston et *al.*, 1991). Elles sont systématiquement observées dans la forme endémique mais n'ont pas pu être détectées dans des cellules tumorales de patients atteints par la forme sporadique (Johnston et *al.*, 1991).

Les éléments régulateurs du locus *IgH*

La régulation des réarrangements et des remaniements des gènes d'immunoglobuline...

Le locus *IgH* murin abrite cinq principales régions potentiellement régulatrices, contenant des éléments *cis*-régulateurs, des régions d'attachement à la matrice (MAR, *matrix attachment regions*) ou des sites d'hypersensibilité à la DNase (hs) (pour revue, Perlot et Alt, 2008) (**Figure 13**). Nous évoquerons dans ce chapitre uniquement les éléments du locus *IgH* ayant une fonction activatrice transcriptionnelle ou isolatrice établie ou supposée. Nous n'évoquerons pas les phénomènes de régulation épigénétique qui contribuent à l'accessibilité du locus (pour revue, Perlot et Alt, 2008).

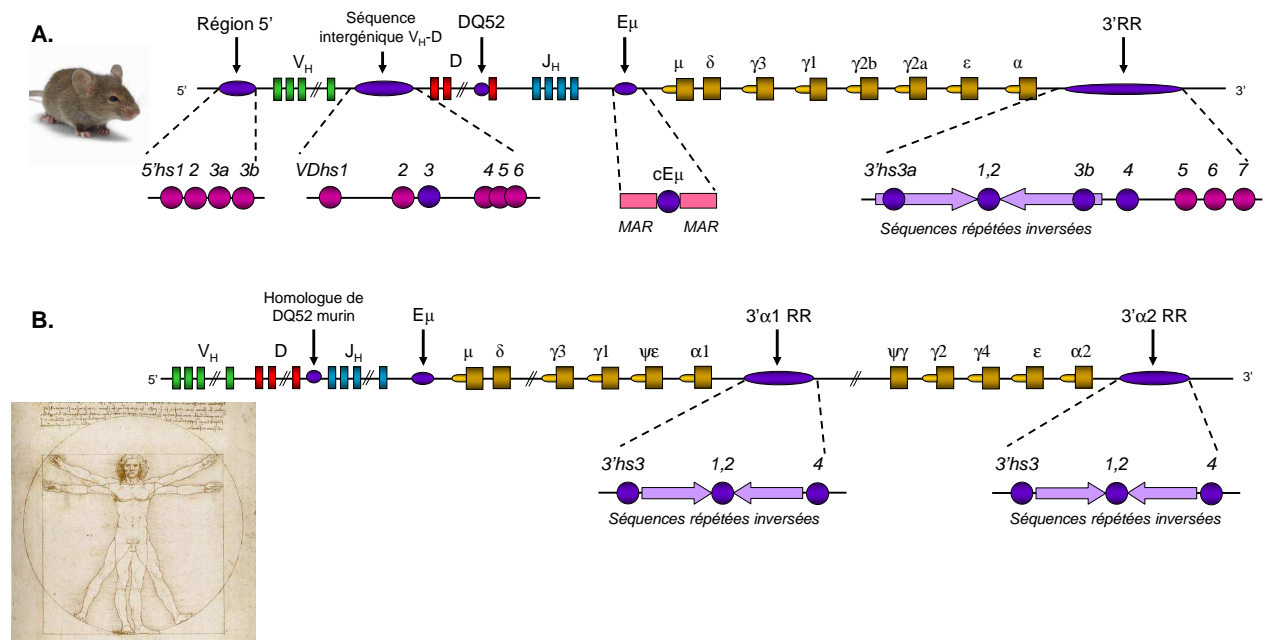


Figure 13. Cartographie du locus *IgH* chez la souris (A) et chez l'homme (B) (pas à l'échelle).

Les rectangles verts, rouges et bleus représentant les segments V_H , D et J_H , les rectangles beiges les segments constants précédés des régions S (sauf $C\delta$). Les figures rondes ou ovales violettes sur la ligne désignent les éléments *cis*-régulateurs avérés ou potentiels du locus. Ils sont signalés par des flèches noires verticales. Dans le détail, les ronds violets foncés sont les activateurs transcriptionnels, les ronds de couleur prune sont les isolateurs ou les éléments *cis*-régulateurs putatifs non caractérisés. Les rectangles roses sont les MAR. Les flèches horizontales parsemées sont les séquences répétées inversées des régions 3'.

Nous n'aborderons que très superficiellement les promoteurs (à l'exception du promoteur-activateur DQ52), en précisant simplement qu'il en existe de deux sortes : les promoteurs de région variable (pV_H) et les promoteurs germinaux (I). Les promoteurs pV_H se situent en amont de chaque région variable V_H . Ils assurent la transcription germinale précédant le réarrangement V_H - D J_H ainsi que la transcription des exons V_H D J_H réarrangés. Ils permettent donc l'accessibilité des segments V_H

Contexte bibliographique

germinaux et assurent l'expression du gène de chaîne lourde réarrangé. Les promoteurs I se situent en amont de chaque gène de région constante, excepté C δ . Ils sont impliqués dans l'initiation de la transcription germinale qui précède la commutation de classe et rend accessibles les segments constants pour la recombinaison. Pour plus de détails, les promoteurs du locus *IgH* sont décrits dans la revue de T. Perlot et F. W. Alt suscitée.

1. LA REGION 5'

Elle contient trois sites d'hypersensibilité à la DNase I : hs1, hs2 et hs3, localisés 32,6 kb, 27,9 kb et 26,2 kb respectivement en 5' du gène *V_HJ558.55*. L'élément hs3 est subdivisé en deux sites différents séparés de 250 pb : un site 5' faible, hs3a, et un site 3' plus fort, hs3b (**Figure 13**). L'élément hs1 fixe plusieurs facteurs de transcription essentiels au développement B et aux recombinaisons du locus *IgH*, comme PU.1, Pax5 ou les facteurs E2A, spécifiquement au stade pro-B. Les sites hs2 et hs3a/b n'ont pas de propriété d'activateurs transcriptionnels, laissant penser qu'ils définiraient la limite ou des éléments isolateurs dans la partie 5' du locus. Dans la séquence d'hs2 est retrouvé un site potentiel de liaison pour le facteur CTCF, impliqué dans l'isolation chromatinienne. Par ailleurs, hs3a contient des sites de liaison pour des facteurs fréquemment associés aux régions d'attachement à la matrice, et pourrait définir les limites chromatinienes nécessaires aux recombinaisons VDJ et l'expression de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Pawlitzyk et *al.*, 2006). Néanmoins, le remplacement individuel d'hs1 par une cassette *pgk-neo^R*, sa délétion propre et la délétion combinée de l'ensemble des quatre sites (hs1-2-3a/b) n'ont pu mettre en évidence aucune fonction *cis*-régulatrice de ces éléments sur le locus *IgH* (Perlot et *al.*, 2010).

2. LA REGION INTERGENIQUE V_H-D

Une région d'environ 90 kb, contenant six sites hs (hs1-hs6), entre le dernier gène *V_H* fonctionnel, *V_H7183.2.3*, et le premier gène D, *DFL16.1*, a été récemment identifiée (**Figure 13**). Hs4 et hs5 sont des isolateurs qui contiennent des sites de liaison pour les facteurs CTCF : ils exercent une fonction de blocage d'activateur et empêchent ainsi les éléments régulateurs forts du locus *IgH* (E μ , la 3'RR, *cf. infra*) d'interagir avec et d'activer les gènes *V_H* au moment inopportun. Hs3 serait un activateur stade-spécifique de la région *V_H*, qui activerait la recombinaison *V_H-DJ_H* (Featherstone et *al.*, 2010 ; Giallourakis et *al.*, 2010). Cette région intergénique *V_H-D* contient un/des

éléments régulateurs qui assureraient le contrôle de la transcription germinale et/ou des recombinaisons VDJ. Ils ont une fonction physiologique suppressive dans les cellules de la lignée T. Dans les cellules pro-B, cette fonction suppressive doit être levée après le réarrangement D-J_H pour favoriser le réarrangement V_H-D-J_H (Giallourakis et al., 2010).

3. LE PROMOTEUR-ACTIVATEUR DQ52

DQ52 est le segment le plus en 3' de la région D et donc le plus proximal par rapport aux segments J_H. Il est préférentiellement utilisé lors des premières tentatives de réarrangement D-J_H au cours de l'ontogénie, chez l'homme comme chez la souris (Bangs et al., 1991 ; Born et al., 1988 ; Nickerson et al., 1989 ; Reth et al., 1986 ; Schroeder et Wang, 1990 ; Tsukada et al., 1990). DQ52 est le seul segment D transcrit avant la réalisation des premiers réarrangements D-J_H (son promoteur est donc activé avant ceux-ci), générant les transcrits germinaux sens μ_0 , dont l'expression est un indicateur précoce de l'engagement dans la lignée B (Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Li et al., 1996 ; Schlissel et al., 1991a), et qui seraient un prérequis pour l'accessibilité de la recombinaison aux régions D-J_H (Alt et al., 1987 ; Schlissel et al., 1991a, 1991b ; Thompson et al., 1995). La même région promotrice peut aussi initier dans une moindre mesure des transcrits antisens (Chakraborty et al., 2007). L'activateur en 5' de DQ52 est un promoteur-activateur synergique d'E μ (Kottman et al., 1994). Sa délétion chez la souris n'inhibe pas le réarrangement D-J_H ni la transcription μ_0 , mais altère l'utilisation des segments J_H les plus éloignés (J_H3 et J_H4) (Nitschke et al., 2001). Par ailleurs, sa délétion conjointe avec E μ a confirmé qu'il n'était pas essentiel aux réarrangements D-J_H ni à la transcription μ_0 (Afshar et al., 2006).

4. L'ACTIVATEUR INTRONIQUE E μ

E μ est le premier activateur transcriptionnel d'immunoglobuline identifié (Banerji et al., 1983 ; Gillies et al., 1983 ; Neuberger, 1983). Il est localisé dans l'intron entre le dernier segment J_H et le gène C μ . Il est constitué d'un activateur de cœur (*core enhancer*) de 220 pb, cE μ (*core E μ*), bordé de part et d'autre par deux MAR (pour revues : Calame et Sen, 2004 ; Perlot et Alt, 2008) (**Figure 13**).

Contexte bibliographique

Les MAR ne régulent pas les recombinaisons D-J_H puis V_H-DJ_H, et ne sont pas capables d'assurer seules les recombinaisons V_H-DJ_H en l'absence de cE μ , qui est donc le seul élément critique (Sakai et *al.*, 1999b). La délétion de cE μ altère significativement les recombinaisons V_H-DJ_H et D-J_H (Perlot et *al.*, 2005). E μ joue un rôle très important dans la régulation de l'accessibilité de la région D-J_H du locus *IgH* pour l'activité recombinase (Afshar et *al.*, 2006). E μ régule la transcription germinale μ_0^5 (Chen et *al.*, 1993) et la transcription intergénique antisens au niveau des segments D, mais n'a pas d'effet sur la transcription intergénique antisens au niveau des segments V_H. E μ jouerait un rôle fondamental dans la recombinaison D-J_H mais pas la recombinaison V_H-DJ_H (Bolland et *al.*, 2007). Néanmoins, la délétion de cE μ diminue, mais ne bloque pas totalement, les recombinaisons VDJ au locus *IgH* (à la différence de l'insertion de *pgk-neo*^R qui bloque le développement des cellules au stade pro-B) : des cellules B périphériques peuvent donc se développer normalement. Elles expriment normalement les immunoglobulines de surface, suggérant que cE μ n'est pas essentiel à l'expression normale des segments VDJ réarrangés (Perlot et *al.*, 2005).

cE μ aurait une contribution très faible, et de façon hautement redondante avec d'autres éléments *cis*-régulateurs du locus, dans le processus de commutation de classe : sa délétion occasionne un léger défaut de commutation de classe (Li et *al.*, 2010b ; Perlot et *al.*, 2005 ; Sakai et *al.*, 1999a). Par son rôle dans la transcription, E μ favoriserait la commutation : la transcription et le recrutement consécutif des facteurs d'épissage permettraient de recruter AID. E μ pourrait aussi faciliter la commutation de classe par ses interactions avec la 3'RR, dans une configuration chromosomique en forme de boucle qui favorise ensuite la synapse S-S, mise en évidence par des expériences de capture des conformation chromosomique (technique dite 3C) (Wuerffel et *al.*, 2007). Par ailleurs, E μ pourrait agir comme un site de recrutement et/ou un centre organisateur pour la machinerie d'hypermutation somatique (Li et *al.*, 2010b).

5. LA REGION REGULATRICE 3' : 3'RR

Après la découverte d'E μ , la présence d'activateurs supplémentaires dans le locus *IgH* a été supposée par l'existence de lignées cellulaires, notamment de plasmocytome de souris, capables d'exprimer leurs gènes de chaîne lourde d'immunoglobuline malgré la délétion d'E μ (Aguilera et *al.*, 1985 ; Eckhardt et Birshstein, 1985 ; Klein et *al.*, 1984 ; Wabl et Burrows, 1984 ; Zaller et Eckhardt, 1985). Par ailleurs, l'oncogène *c-myc* peut être activé après translocation dans le locus *IgH* sans être forcément juxtaposé à E μ (Neuberger et Calabi, 1983). D'autres activateurs transcriptionnels,

⁵ Les transcrits μ_0 sont initiés en amont de DQ52 et se terminent en aval des exons C μ .

répartis sur près de 30 kb, ont pu être ainsi découverts en 3' du locus *IgH* chez la souris (pour revue, Khamlichi et *al.*, 2000) :

- hs3a, 2 kb en aval de C α (Matthias et Baltimore, 1993) ;
- hs1,2, 16 kb en aval de C α (Dariavach et *al.*, 1991 ; Lieberson et *al.*, 1991) ;
- hs3b, 29 kb en aval de C α (Giannini et *al.*, 1993) ;
- hs4, 33 kb en aval de C α (Michaelson et *al.*, 1995) ;

En aval de ces quatre activateurs, trois sites hs isolateurs définissent la frontière 3' du locus *IgH* : hs5, hs6 et hs7 (Garrett et *al.*, 2005) (**Figure 13**).

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la 3'RR ont fait l'objet d'une première revue détaillée en 2000, rédigée au laboratoire (Khamlichi et *al.*, 2000). Les activateurs hs3a, hs1,2 et hs3b définissent un grand palindrome dont hs1,2 occupe le centre. Il est flanqué par de longues séquences répétées et inversées de plus d'une dizaine de kb, de part et d'autre d'hs1,2. Ces séquences répétées inversées incluent les activateurs hs3a et hs3b, qui présentent 97% de similitudes et se trouvent en orientation inverse, renforçant la configuration palindromique (Chauveau et Cogné, 1996 ; Saleque et *al.*, 1997). Les éléments hs1,2, hs3a et hs3b sont actifs aux stades tardifs de la différenciation B, tandis qu'hs4 est actif tout au long du développement B. Les mutations/délétions des activateurs ainsi que les études à l'aide de gènes rapporteurs ont montré que la 3'RR est composée d'activateurs transcriptionnels faibles caractérisés par des redondances fonctionnelles mais également capables de synergie. Ainsi, dans le locus endogène, chaque activateur n'est individuellement pas indispensable (Bébin et *al.*, 2010 ; Manis et *al.*, 1998), mais *in vitro*, chacun coopère avec les autres pour produire un effet synergique sur l'expression de gènes rapporteurs (Chauveau et *al.*, 1998 ; Madisen et Groudine, 1994 ; Ong et *al.*, 1998 ; Stevens et *al.*, 2000) (pour revue, Khamlichi et *al.*, 2000).

Une caractéristique du locus *IgH* humain est la duplication des gènes γ , ϵ et α qui définit deux ensembles en tandem : γ_3 , γ_1 , $\psi\epsilon$ et α_1 d'une part, $\psi\gamma$, γ_2 , γ_4 , ϵ et α_2 d'autre part. En aval du gène C α , chaque ensemble possède une région régulatrice homologue à la 3'RR de la souris. Chaque région contient trois activateurs transcriptionnels semblables aux activateurs murins hs3, hs1,2 et hs4. Le locus humain ne contient pas d'activateur équivalent à hs3b murin. L'élément hs1,2 est également flanqué de régions répétées inversées (plus courtes que chez la souris) qui définissent un palindrome dont hs1,2 est le centre de symétrie. Les activateurs humains suivent le même profil d'expression que les activateurs murins (pour revue, Khamlichi et *al.*, 2000) (**Figure 13**).

Contexte bibliographique

Au cours des dix dernières années, de multiples avancées ont été accomplies et ont peu à peu permis de lever le voile sur les fonctions et les mécanismes d'action de la 3'RR. Les connaissances ont pu être actualisées à « mi-parcours », en 2004, dans le cadre d'un ouvrage consacré à la biologie de la cellule B (Cogné et Birshtein, 2004), et très récemment dans deux revues auxquelles nous avons contribué (Pinaud et *al.*, 2011 ; Vincent-Fabert et *al.*, 2010a). Deux points essentiels ont été mis en évidence à propos du rôle de la 3'RR dans le développement normal, du lymphocyte B : elle assure d'une part une commutation de classe efficace lors de la réaction du centre germinatif, d'autre part l'hypertranscription du locus et l'expression de la chaîne lourde d'immunoglobuline dans les plasmocytes. En outre, elle est impliquée dans le développement pathologique du lymphocyte B : elle est responsable de la dérégulation d'oncogènes qui se retrouvent transloqués dans le locus *IgH* (*cf.* chapitre 2). Initialement, E_{μ} avait été considéré comme le principal élément *cis*-régulateur du locus à l'origine de transformation de la cellule, d'autant plus que les oncogènes transloqués au voisinage des segments V_H , D ou J_H lors de la recombinaison VDJ ou au niveau de l'exon V_HDJ_H réarrangé lors de l'hypermutation somatique sont juxtaposés à E_{μ} . Après la réalisation de souris transgéniques surexprimant divers oncogènes sous le contrôle d' E_{μ} , plusieurs expériences de transgénèse additive ou d'insertion par recombinaison homologue (*knock-in*) ont finalement montré que la dérégulation par la 3'RR était nettement plus pertinente pour expliquer l'initiation de la lymphomagenèse et reflétait plus fidèlement le phénotype mature observé dans la majorité des lymphomes. L'un de ces modèles, les souris *c-myc-3'RR*, précédemment mis au point au laboratoire, a été exploité lors de notre thèse (Truffinet et *al.*, 2007). Par ailleurs, dans des lignées de lymphomes, des interactions physiques à longue distance ont été détectées, par la technique 3C, entre la 3'RR et la région promotrice de *c-myc* (Ju et *al.*, 2007) ou de *Bcl-2* (Duan et *al.*, 2008) transloqués. Elles permettraient d'illustrer l'origine de la dérégulation transcriptionnelle et de l'expression constitutive des oncogènes après translocation dans le locus *IgH*, observées par exemple lors du lymphome de Burkitt et du lymphome folliculaire, respectivement (pour revues : Pinaud et *al.*, 2011 ; Vincent-Fabert et *al.*, 2010a).

Pages suivantes : les deux revues les plus récentes sur la 3'RR, auxquelles nous avons contribué.

Vincent-Fabert C., Fiancette R., Cogné M., Pinaud E. et Denizot Y., 2010a. **The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis.** *Eur. J. Immunol.* 40(12): 3306-3311.

Pinaud E., Marquet M., Fiancette R., Péron S., Vincent-Fabert C., Denizot Y. et Cogné M., 2011. **The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind.** *Adv. Immunol.* Sous presse.

The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Michel Cogné, Eric Pinaud, Yves Denizot

Université de Limoges, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UMR 6101, France

Corresponding author details:

Y. Denizot, PhD, Université de Limoges, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UMR 6101, Faculté de Médecine, 2 rue Dr. Marcland, 87025 Limoges, France.

Phone: (33) 5 55 43 58 96

Fax: (33) 5 55 43 58 97

e-mail: yves.denizot@unilim.fr

Acknowledgements: Christelle Vincent-Fabert and Rémi Fiancette contributed equally for this review. This work was supported in part by a grant from « La ligue Contre le Cancer, Comité de la Corrèze et de la Haute-Vienne » and « Le Lions Club de la Corrèze, Zone 33 District 103 Sud ». C. Vincent-Fabert was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

Publiée dans *Eur. J. Immunol.* 40(12): 3306-3311.

The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind.

Eric Pinaud*, Marie Marquet, Rémi Fiancette, Sophie Péron, Christelle Vincent-Fabert, Yves Denizot and Michel Cogné

UMR CNRS 6101, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, France

*Corresponding author: Eric Pinaud, UMR CNRS 6101, Faculté de Médecine, 2 rue Dr. Marcland, 87025, Limoges, France - eric.pinaud@unilim.fr

Revue acceptée dans *Adv. Immunol.*, sous presse

Abstract : *Antigen receptor gene loci are among the most complex in mammals. The IgH locus, encoding the immunoglobulin heavy chain (IgH) in B lineage cells, undergo major transcription-dependent DNA remodelling events, namely V(D)J recombination, Ig class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). Various cis-regulatory elements (encompassing promoters, enhancers and chromatin insulators) recruit multiple nuclear factors in order to ensure IgH locus regulation by tightly orchestrated physical and/or functional interactions. Among major IgH cis-acting regions, the large 3' regulatory region (3'RR) located at the 3' boundary of the locus includes several enhancers and harbors an intriguing quasi-palindromic structure. In this review we report progress insights made over the past decade in order to describe in more details the structure and functions of IgH 3'RRs in mouse and human. Generation of multiple cellular, transgenic and knock-out models helped out to decipher the function of the IgH 3' regulatory elements in the context of normal and pathologic B cells. Beside its interest in physiology, the challenge of elucidating the locus-wide cross-talk between distant cis-regulatory elements might provide useful insights into the mechanisms that mediate oncogene deregulation after chromosomal translocations onto the IgH locus.*

La prolifération, la transformation et la réponse au stress

Le cycle cellulaire, l'oncogène c-myc, la « sentinelle du génome » p53

1. LE CYCLE CELLULAIRE ET L'INDUCTION DE LA PROLIFERATION

1.1. Les événements du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est la séquence finement régulée des événements qui permettent la reproduction de la cellule eucaryote. Les étapes du cycle de la cellule eucaryote sont définies d'après les événements chromosomiques (**Figure 14**). Tôt au cours du cycle cellulaire, l'ADN est répliqué et les chromosomes dupliqués : c'est la phase S. L'autre étape importante du cycle cellulaire est la phase M, composée de deux événements : la division nucléaire, ou mitose, et la division cellulaire, ou cytokinèse. Le délai qui s'écoule entre la fin d'une phase M et le début de la suivante est appelé interphase. D'autres phases, appelées phases G (*gap*), ponctuent le cycle cellulaire entre les phases S et M : la phase G1, avant la phase S, et la phase G2 avant la phase M (pour revue : Morgan, 2007).

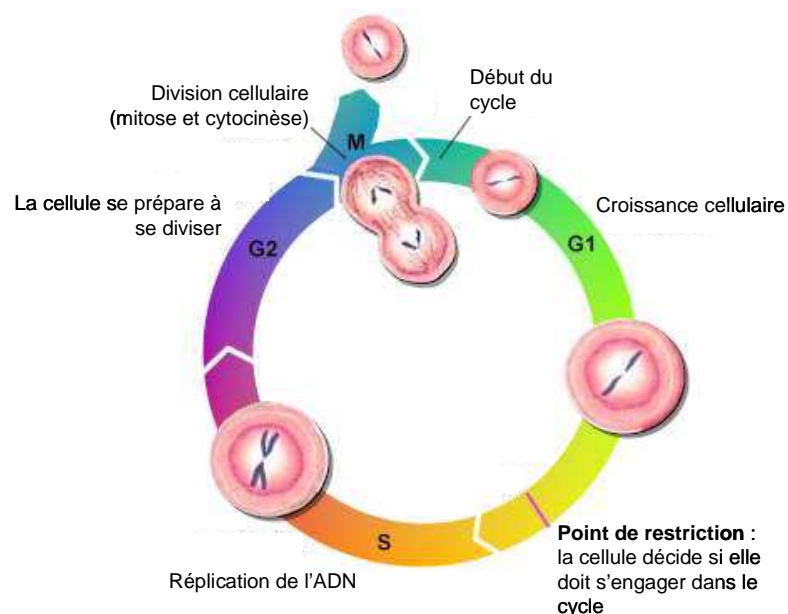


Figure 14. Représentation schématique des différentes phases du cycle cellulaire.
D'après une figure extraite du site internet <http://kirschner.med.harvard.edu>.

1.2. Le système de contrôle du cycle cellulaire

1.2.1. Description et présentation

Le système de contrôle du cycle cellulaire assure la régulation de l'ordre et du minutage des différents événements du cycle cellulaire. Il coordonne le franchissement de trois points de contrôle majeurs : le point de restriction (contrôle l'entrée en phase G1 tardive), le point de transition G2/M (contrôle l'entrée en phase M) et la transition métaphase-anaphase (induction des événements terminaux de la mitose). Il repose sur des séries d'oscillations du niveau d'activité de différentes protéines kinases (pour revues : Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007).

Les acteurs clés du système de contrôle sont les kinases dépendant des cyclines, ou CDK (*cyclin-dependant kinase*). Leur concentration reste stable au cours du cycle cellulaire. En revanche, leur activité catalytique oscille rapidement lorsque la cellule progresse dans le cycle cellulaire, ce qui provoque un changement de l'état de phosphorylation, donc de l'état d'activation, de leurs protéines cibles qui contrôlent le cycle cellulaire. Les variations de leur activité dépendent essentiellement des variations du niveau des cyclines, leurs sous-unités régulatrices. Aux différentes étapes du cycle cellulaire, des types de cyclines différents sont produits : des cyclines G1, G1/S, S et M (ou cyclines des phases G1, G1/S, S et M). Plusieurs complexes cycline-CDK vont donc se succéder au cours du cycle cellulaire (Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007) (**Figure 15**).

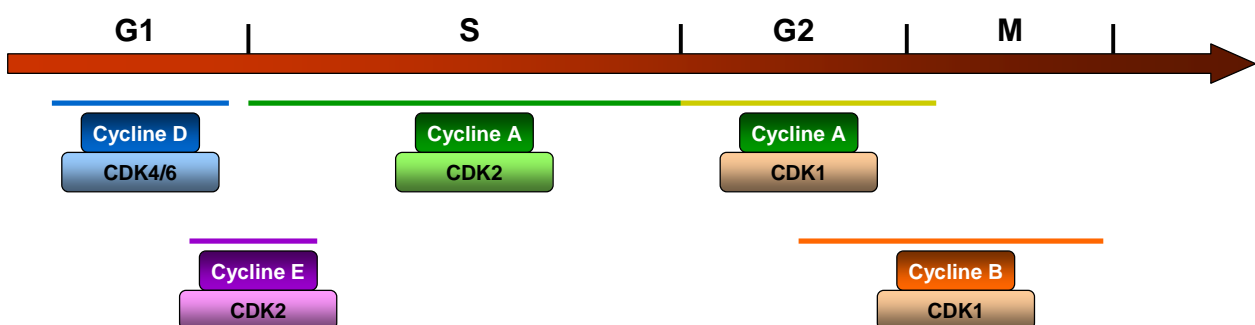


Figure 15. Les principaux complexes cycline-CDK impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire chez l'homme.

Les traits horizontaux indiquent la durée approximative d'activation et de fonction des complexes correspondants. D'après Morgan, 1997.

1.2.2. Les kinases dépendant des cyclines (CDK)

Les CDK sont des sérine/thréonine kinases de 30 à 40 kDa. Leur pouvoir catalytique est activé par la liaison d'une sous-unité régulatrice : la cycline. L'activation complète de la CDK

nécessite aussi le plus souvent la phosphorylation d'un résidu thréonine au voisinage du site actif. Chez les eucaryotes multicellulaires, le cycle cellulaire est contrôlé par deux CDK : CDK1, qui agit durant la phase M, et CDK2 qui agit durant la phase S. Les cellules animales possèdent en plus deux autres CDK qui contrôlent l'entrée en cycle, au cours de la phase G1 : CDK4 et CDK6. Les CDK agissent sur la progression du cycle cellulaire en phosphorylant une multitude de protéines cibles. L'oscillation de l'activité des CDK est le fondement de la progression ordonnée du cycle cellulaire (Giacinti et Giordano, 2006 ; et pour revues : Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007).

1.2.3. Les cyclines

Les cyclines représentent une famille de protéines qui se lient aux et activent les CDK. Elles doivent leur nom aux importantes fluctuations de leurs concentrations au cours du cycle cellulaire : ces fluctuations contribuent aux oscillations de l'activité enzymatique des CDK. Il existe quatre grandes familles de cyclines selon l'étape du cycle qu'elles contribuent à réguler (*cf. supra*). Les complexes cycline-CDK organisent et planifient la progression de la cellule le long des différentes phases de son cycle (Giacinti et Giordano, 2006). Chez les vertébrés, la cycline G1/S est la cycline E, qui s'associe à CDK2 pour induire le franchissement du point de restriction et l'engagement de la cellule dans le cycle cellulaire. La cycline de phase S est la cycline A, qui s'associe à CDK1 ou CDK2 pour stimuler la réplication de l'ADN. La cycline de phase M est la cycline B. Les cyclines de la phase G1, toujours chez les vertébrés, sont les cyclines D : elles coordonnent la croissance cellulaire avec l'entrée de la cellule dans un nouveau cycle (Sherr, 1995). Les principaux partenaires catalytiques des cyclines D sont CDK4 et CDK6, avec lesquelles elles forment des holoenzymes dont les substrats préférentiels sont les protéines de la famille du rétinoblastome (*cf. infra*) (pour revues : Giacinti et Giordano, 2006 ; Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007 ; Sherr, 1993 ; Sherr, 1995).

A propos de la cycline D1...

Le gène codant la cycline D1 (*CCND1*, *bcl-1* ou *PRAD1*) est localisé sur le chromosome 11q13 chez l'homme (Motokura *et al.*, 1991 ; Tsujimoto *et al.*, 1985) et sur le chromosome 7 chez la souris. Il comprend cinq exons qui s'étendent sur environ 15 kb (Motokura *et al.*, 1993). A l'origine, le locus a été cloné d'après son implication dans des réarrangements chromosomiques lors d'adénomes de la parathyroïde (Motokura *et al.*, 1991). La cycline D1 a été identifiée simultanément par deux groupes, d'une part comme le produit d'un gène inductible par des facteurs de croissance (Matsushima *et al.*, 1991), d'autre part par sa capacité de compenser la perte de cyclines de phase G1

Contexte bibliographique

chez la levure (Xiong et *al.*, 1991) (pour revues : Coqueret, 2002 ; Fu et al., 2004 ; Knudsen et al., 2006)

1.2.4. Les inhibiteurs des CDK

Les inhibiteurs des CDK, CKI (*CDK inhibitor proteins*), se fixent aux complexes cycline-CDK et les inactivent : ils assurent le bon déroulement du cycle et sont également impliqués dans l'arrêt du cycle en phase G1 lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables, ou en réponse aux signaux intracellulaires tels que les dommages à l'ADN (pour revues : Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007 ; Sherr et Roberts, 1999).

Dans les cellules animales, les CKI sont répartis en deux familles structurales et fonctionnelles : la famille Cip/Kip et la famille INK4 (**Figure 16**). La famille Cip/Kip comprend, chez les mammifères, p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1) et p57 (Kip2). Ces inhibiteurs agissent sur plusieurs complexes cycline-CDK, en interagissant à la fois avec la cycline et avec la CDK, ce qui crée une modification conformationnelle qui abolit la fonction catalytique de la CDK. Ils exercent des actions complexes : ils bloquent le déroulement du cycle cellulaire en inhibant les CDK de phases G1/S et S, mais ils peuvent aussi favoriser l'entrée en cycle en activant les CDK de phase G1. En effet, de façon surprenante, les protéines Cip/Kip potentialisent l'activation des CDK4/6, en favorisant leur liaison avec la cycline D. La famille INK4 regroupe p15^{INK4b} (plus simplement p15), p16^{INK4a} (p16), p18^{INK4c} (p18) et p19^{INK4d} (p19) chez les mammifères. Ce sont seulement des inhibiteurs et ils ciblent spécifiquement les formes monomériques de CDK4 et CDK6. Ils inhibent leur activité en réponse à des signaux anti-prolifératifs. En se fixant sur la CDK, ils induisent des modifications de la conformation qui empêchent d'une part la liaison de l'ATP et d'autre part l'interaction avec la cycline D (Besson et *al.*, 2008 ; Malumbres et Barbacid, 2001 ; Morgan, 2007 ; Sherr et Roberts, 1999) (**Figure 16**).

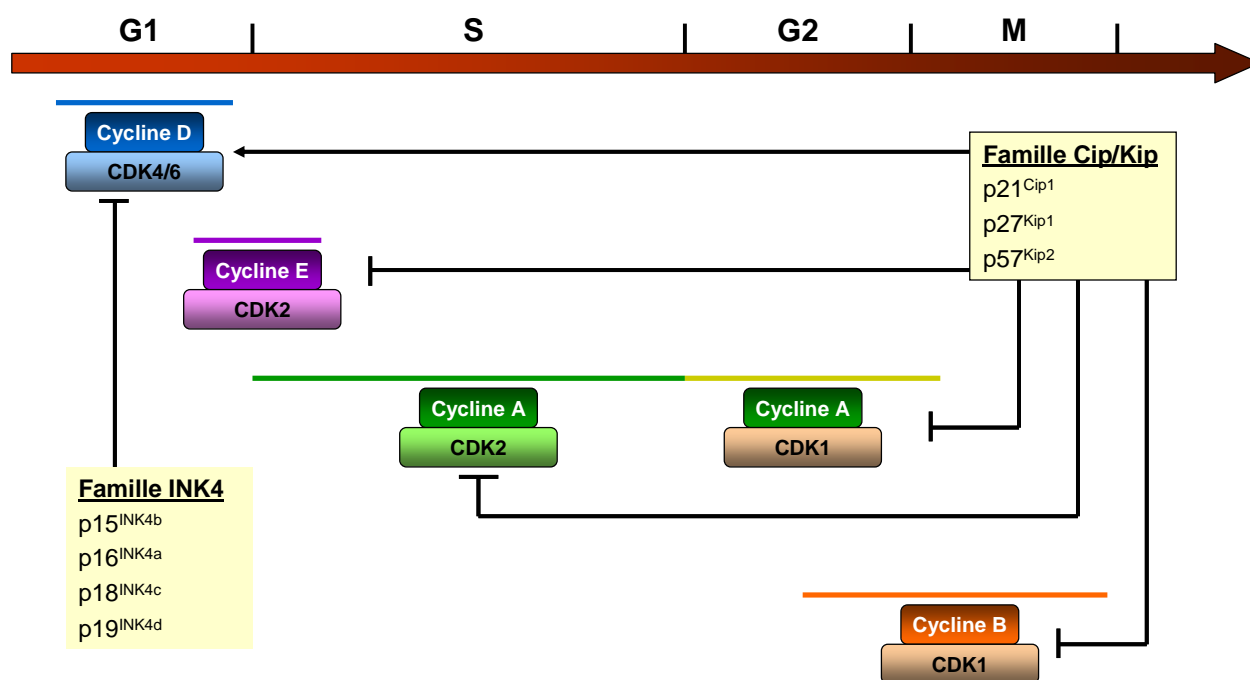


Figure 16. Les inhibiteurs des CDK (CKI).

Les protéines INK4 se lient seulement à CDK4 et CDK6 mais à aucune autre CDK ni aux cyclines D. Les protéines Cip/Kip agissent de façon plus large et affectent l'activité des kinases dépendant des cyclines D, E, A et B (pour revues : Besson *et al.*, 2008 ; Sherr et Roberts, 1999).

1.3. La prolifération cellulaire

A l'exception de l'embryon qui subit une prolifération cellulaire intense et continue, chez les organismes multicellulaires, le taux de division cellulaire est finement régulé (homéostasie). Le point de restriction est décisif pour déterminer le taux de division. Les signaux mitogènes et autres facteurs régulateurs de la prolifération cellulaire contrôlent le taux de division cellulaire en agissant sur les éléments qui coordonnent le franchissement du point de restriction. Ils augmentent par exemple la production des CDK de la phase G1 ou influencent les voies de signalisation qui contrôlent les protéines régulatrices ou les CDK de phase G1/S. Lorsque les conditions sont défavorables, le passage du point de restriction est retardé ou bloqué, et les cellules peuvent devenir quiescentes (phase G0). Les altérations génétiques qui dérèglent la signalisation mitogénique augmentent la prolifération cellulaire et peuvent prédisposer au cancer (Morgan, 2007).

1.3.1. Activation de l'expression génique au point de restriction

L'événement clef du passage du point de restriction est l'induction de l'expression des gènes de la phase G1/S par des protéines régulatrices, dont les plus importantes sont celles de la famille E2F. Ce sont des régulateurs transcriptionnels qui contrôlent l'expression de nombreux gènes en fin de phase G1. Les produits de ces gènes assurent l'entrée irréversible dans le cycle (cyclines, CDK) et

Contexte bibliographique

la réplication de l'ADN (ADN polymérase et cofacteurs). Les facteurs E2F-1 à E2F-5, qui interagissent avec les protéines de la famille du rétinoblastome, sont divisés en deux groupes fonctionnels : les activateurs (E2F-1, -2 et -3), qui augmentent l'expression de leurs gènes cibles, et les répresseurs (E2F-4 et -5), qui se lient aux promoteurs des gènes des phases G1/S dans les cellules quiescentes et inhibent leur expression (pour revues : Cobrinik, 2005 ; Dyson, 1998 ; Genovese et *al.*, 2006 ; Morgan, 2007).

L'activité des protéines E2F est régulée par les protéines de la famille du rétinoblastome, qui sont au nombre de trois chez les mammifères : la protéine éponyme pRb (p105), ou protéine du rétinoblastome, p107 et p130 (pRb2) (pour revues : Cobrinik, 2005 ; Dick, 2007 ; Genovese et *al.*, 2006 ; Giacinti et Giordano, 2006 ; Morgan, 2007). Elles se lient aux facteurs E2F de façon dépendante du cycle cellulaire. L'interaction des protéines du rétinoblastome, dans leur état hypophosphorylé (forme active), avec les membres de la famille E2F inhibe l'expression des gènes cibles d'E2F dans les cellules quiescentes. Les protéines de la famille du rétinoblastome inhibent l'expression des gènes cibles d'E2F par deux types de mécanismes. D'une part, elles peuvent se lier à leur domaine d'activation, le masquer et bloquer l'interaction avec le promoteur (répression passive). D'autre part, elles peuvent interagir avec des enzymes de modification et de remodelage de la chromatine, les recruter au niveau des promoteurs et établir une structure chromatiniennne répressive (répression active) (pour revues : Cobrinik, 2005 ; Genovese et *al.*, 2006 ; Giacinti et Giordano, 2006 ; Morgan, 2007) (**Figure 17**).

1.3.2. Régulation des complexes E2F-pRb

Lorsque les cellules ne reçoivent pas de signaux mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire en phase G1 pour entrer en phase G0 et devenir des cellules quiescentes. L'expression des gènes E2F-dépendants est inhibée par les facteurs E2F répresseurs liés à p107 ou p130, et par la faible quantité de facteurs E2F activateurs fonctionnels. Lorsque les cellules quiescentes stimulées entrent dans le cycle cellulaire, l'augmentation de l'expression des gènes G1/S qui doit avoir lieu au moment du franchissement du point de restriction requiert le retrait des facteurs E2F répresseurs des promoteurs des gènes cibles et leur remplacement par des facteurs E2F activateurs (pour revues : Cobrinik, 2005 ; Giacinti et Giordano, 2006 ; Morgan, 2007) (**Figure 17**).

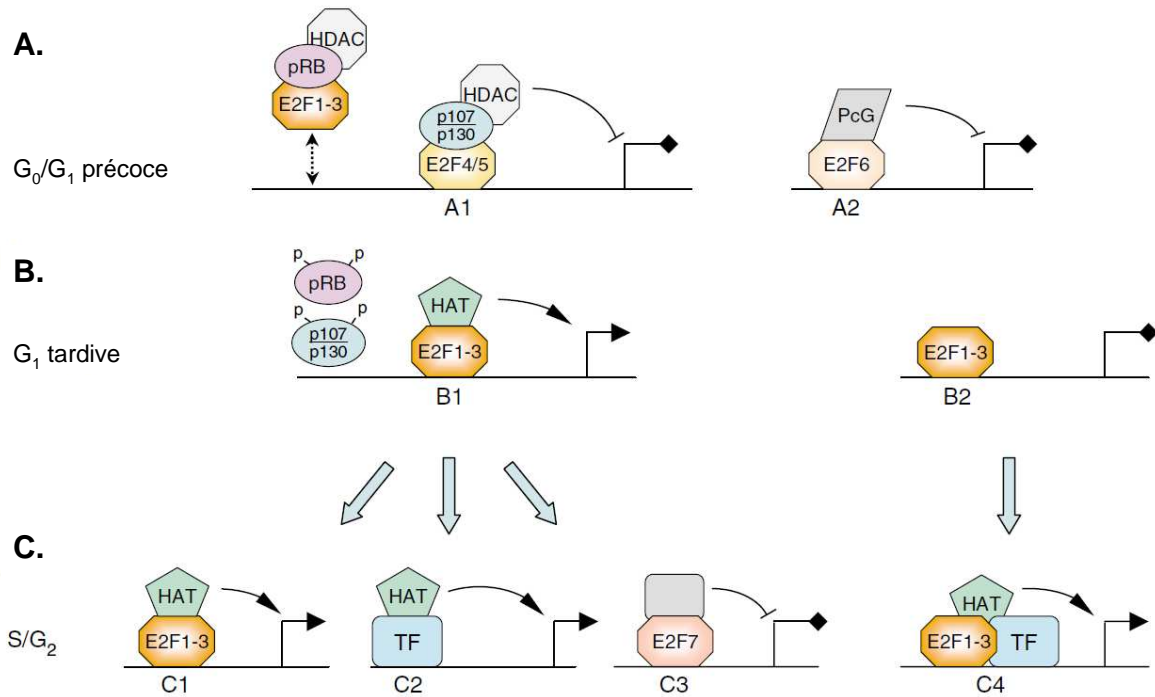


Figure 17. Les complexes entre les protéines de la famille du rétinoblastome et les facteurs E2F au niveau des promoteurs cibles d'E2F.

A. En phases G₀ et G₁ précoce. B. En phase G₁ tardive. C. En phases S et G₂. PcG : protéine du groupe Polycomb. TF : facteur de transcription. Les flèches noires coudées terminées par un triangle symbolisent l'expression des gènes cibles, les flèches noires coudées terminées par un carré la répression. Extrait de Cobrinik, 2005.

Au moment où la cellule sort de la quiescence et entre dans le cycle cellulaire, en réponse aux signaux mitogènes, les complexes cycline D-CDK4 ou cycline D-CDK6 sont activés. Ils vont alors catalyser la phosphorylation de pRb, p107 et p130, qui provoque leur dissociation des facteurs E2F au point de restriction. Les complexes cycline D-CDK permettent de commencer à lever l'effet inhibiteur des protéines de la famille du rétinoblastome. En effet, ils ne phosphorylent que partiellement celles-ci. Les complexes cycline E-CDK2, qui apparaissent en fin de phase G₁, prennent la suite, assurent la phosphorylation complète de pRb, p107 et p130 et permettent l'activation complète des facteurs E2F activateurs (Brown et *al.*, 1999 ; Hatakeyama et *al.*, 1994 ; Lundberg et Weinberg, 1998 ; Poznic, 2009) (**Figure 18**).

(Pour revues, spécifiquement sur le rôle de la cycline D1 et de CDK4/6 dans la régulation du cycle cellulaire : Fu et *al.*, 2004 ; Knudsen, 2006 ; Knudsen et *al.*, 2006).

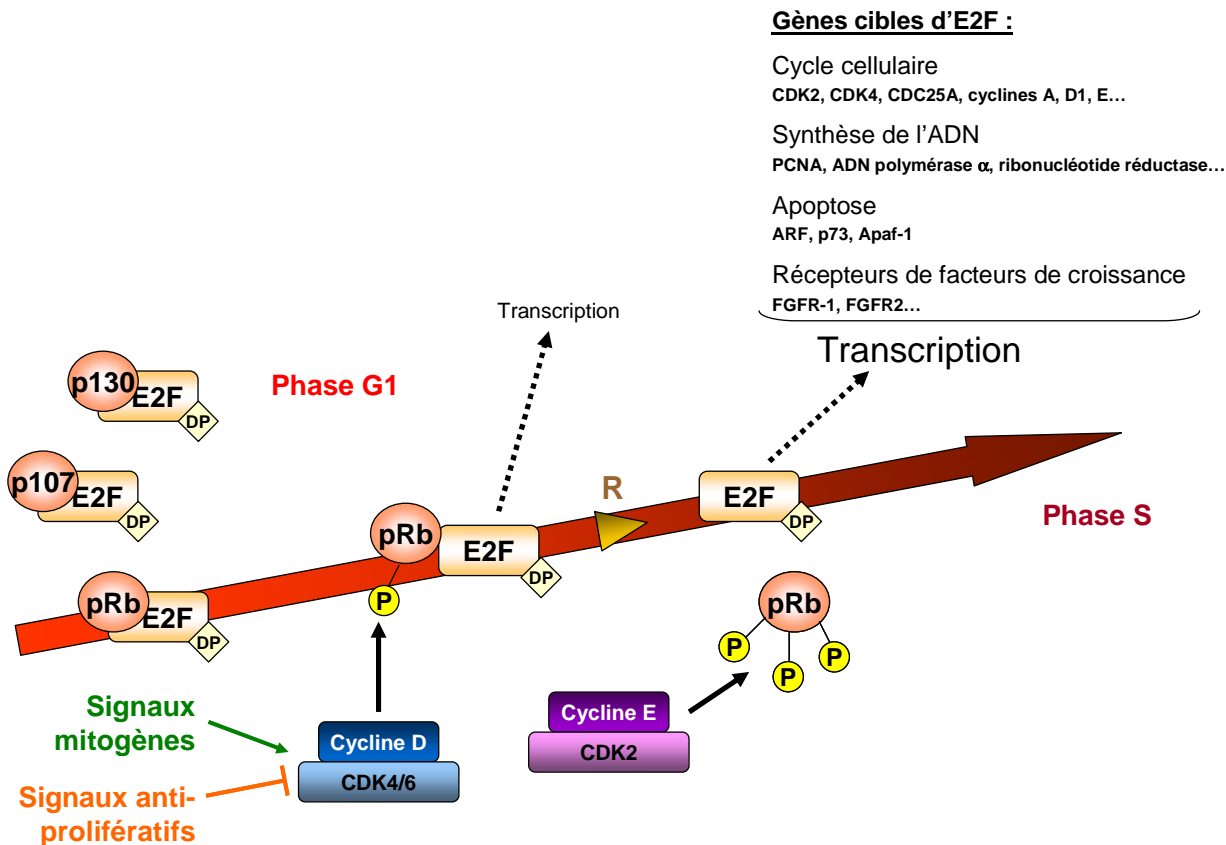


Figure 18. Le franchissement du point de restriction (R) et l'entrée en phase S.

1.3.3. Activation des CDK de la phase G1 par les mitogènes

Les mitogènes sont des peptides solubles ou de petites molécules sécrétées par les cellules voisines, ou encore des composants insolubles de la matrice extracellulaire. Ils stimulent la cellule en se fixant à des récepteurs transmembranaires qui transmettent le signal mitogénique dans la cellule. Les mitogènes stimulent l'expression des gènes des cyclines D en induisant notamment l'activation de deux protéines régulatrices de gènes : AP-1 qui stimule l'expression du gène de la cycline D1, et myc qui augmente légèrement l'expression des gènes de la cycline D2 et de CDK4.

Les complexes cycline D-CDK dans les cellules quiescentes sont inhibés par la phosphorylation de la cycline D1 sur la thréonine 286 (Thr286, et les Thr280 et -283 pour les cyclines D2 et D3 respectivement), assurée par la glycogène synthase kinase 3β (GSK3 β). Elle induit l'exportation nucléaire de la cycline D et sa dégradation cytoplasmique. La signalisation générée par les mitogènes diminue l'activité de la GSK3 β . Ainsi, lorsque la cellule est engagée dans le cycle cellulaire, la cycline D1 n'est plus phosphorylée sur la Thr 286 et des complexes cycline D-CDK stables peuvent s'accumuler dans le noyau. La GSK3 β phosphoryle et inhibe aussi d'autres molécules de signalisation importantes pour l'entrée en cycle, notamment les facteurs de

transcription AP-1 et myc : son inhibition par les signaux mitogènes favorise également l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription (Morgan, 2007) (**Figure 19**).

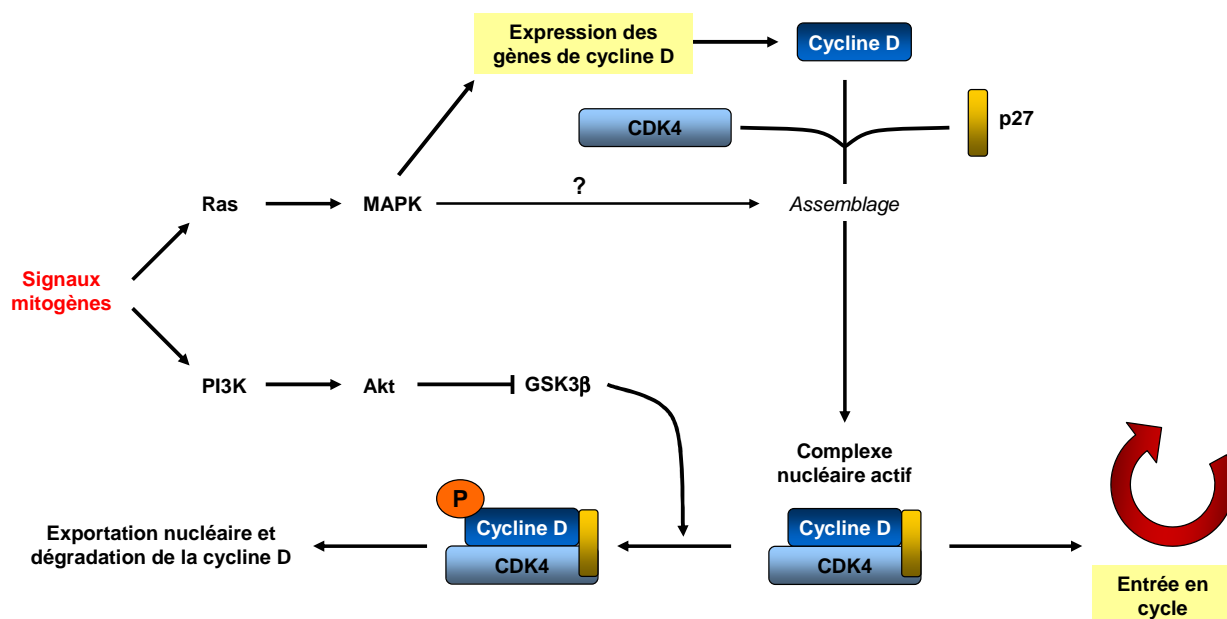


Figure 19. Le contrôle mitogénique de l'activité des CDK de la phase G1.

Les signaux mitogènes augmentent l'activité kinase en G1 par plusieurs mécanismes. D'après Morgan, 2007.

Ensuite, pour assurer la réalisation du cycle complet, les complexes cycline E-CDK2 (transition G1/S) et cycline A-CDK2 (phase S) doivent aussi être activés. Leur activation est largement conditionnée par l'activation préalable des complexes cycline D-CDK4/6 (pour revue : Morgan, 2007).

1.3.4. Autres fonctions de la cycline D1 et de CDK4 sur le cycle cellulaire

D'autres substrats de cycline D1-CDK4, qui interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire, ont été identifiés. Les complexes cycline D-CDK4 (mais aussi cycline E-CDK2 et cycline A-CDK2) phosphorylent CDT1, un composant du complexe de pré-réplication. CDT1 phosphorylé est ensuite ubiquitiné puis dégradé par protéolyse quand la cellule entre en phase S. Sa dégradation est essentielle pour éviter la reformation d'un complexe de pré-réplication après que la réplication initiale est déjà commencée, et empêcher ainsi la re-réplication de l'ADN. Ce mécanisme est l'un des garants de la stabilité du génome (Liu et *al.*, 2004). La signalisation induite par le TGF- β , transduite par les Smads, inhibe la prolifération en induisant un arrêt du cycle en phase G1. Smad3 et Smad2, qui présentent des sites consensus, sont phosphorylés par CDK4 (et CDK2), ce qui inhibe leur activité transcriptionnelle et leur fonction antiproliférative (Liu et Matsuura, 2005 ; Matsuura et *al.*, 2004). Dans les conditions physiologiques, elle facilite la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Cette fonction peut néanmoins avoir une contrepartie maligne : les cellules

Contexte bibliographique

cancéreuses contiennent souvent un niveau élevé d'activité CDK, dû à l'amplification, la translocation ou la surexpression du gène de la cycline D1, ou à l'inactivation de p16. Une phosphorylation intensive des Smads par les CDK favoriserait la résistance des tumeurs à l'inhibition de croissance induite par le TGF- β (Matsuura et *al.*, 2004).

La cycline D1 agit également sur le cycle cellulaire par des mécanismes indépendants des kinases. Par exemple, elle interagit directement avec et séquestre p21 et p27 : elle les empêche d'inhiber CDK2. Ainsi, la cycline D1 favorise aussi indirectement l'activité CDK2 et la transition G1-S (Knudsen, 2006).

2. L'ONCOGENE c-MYC

2.1. La structure du gène et de la protéine

2.1.1. Le gène c-myc

Le gène *c-myc* est localisé sur le chromosome 8 chez l'homme et sur le chromosome 15 chez la souris. Il est formé de trois exons, dont le premier est non codant. Il possède quatre promoteurs : P0 (seulement chez l'homme), P1, P2 et P3. P1 et P2 sont les deux promoteurs majeurs. Dans les cellules normales, 75 à 90 % des transcrits sont initiés à partir de P2, 10 à 25 % à partir de P1 et moins de 5 % à partir de P0 et P3. Le gène *c-myc* contient également deux sites d'initiation de la traduction, l'un (CTG) à l'extrémité 3' de l'exon 1, l'autre (ATG) à l'extrémité 5' de l'exon 2, qui donnent soit la protéine c-myc 1 (67 kDa) soit la protéine c-myc 2 (64 kDa), dont les transcrits sont initiés à partir de P1 ou P2, respectivement (pour revues : Facchini et Penn, 1998 ; Ryan et Birnie, 1996 ; Wierstra et Alves, 2008) (**Figure 20**).

2.1.2. La protéine c-myc

L'oncoprotéine c-myc est organisée en trois grands domaines (**Figure 20**) :

- un domaine d'activation de la transcription (TAD), dans sa partie N-terminale (acides aminés 1 à 143 chez l'homme), qui contient deux éléments très conservés : les boîtes d'homologie *myc* (*myc homology boxes*) I et II, ou MBI (résidus 44 à 63) et MBII (résidus 128 à 143). Dans la région MBI, c-myc est finement régulée par des phosphorylations sur la Thr58 et la Ser62. MBII est importante pour l'activation et la répression transcriptionnelles, c'est la région

d'interaction avec TRRAP (*transactivation/transformation-associated protein*) et d'autres cofacteurs impliqués dans la transformation ;

- une région centrale contenant :
 - une séquence de localisation nucléaire (SLN, résidus 320 à 328) ;
 - les boîtes myc MBIIIa (résidus 188 à 199), impliquée dans la transformation cellulaire, MBIIIb (résidus 259 à 270), dont la fonction n'est pas encore identifiée, et MBIV (résidus 304 à 324) qui contribue à la liaison à l'ADN, l'apoptose, la transformation et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Cowling et *al.*, 2006) ;
- un domaine C-terminal contenant :
 - une région basique (bas., résidus 355 à 369), qui assure la liaison spécifique de c-myc associé à max (*myc-associated protein X*) à ses séquences cibles sur l'ADN, et joue aussi un rôle dans la transformation ;
 - un motif « hélice-boucle-hélice-*leucine zipper* » (HBH-LZ, résidus 370 à 439), impliqué dans l'interaction avec max, et qui présente aussi un potentiel transformant.

(Pour revues : Facchini et Penn, 1998 ; Meyer et Penn, 2008 ; Ryan et Birnie, 1996)

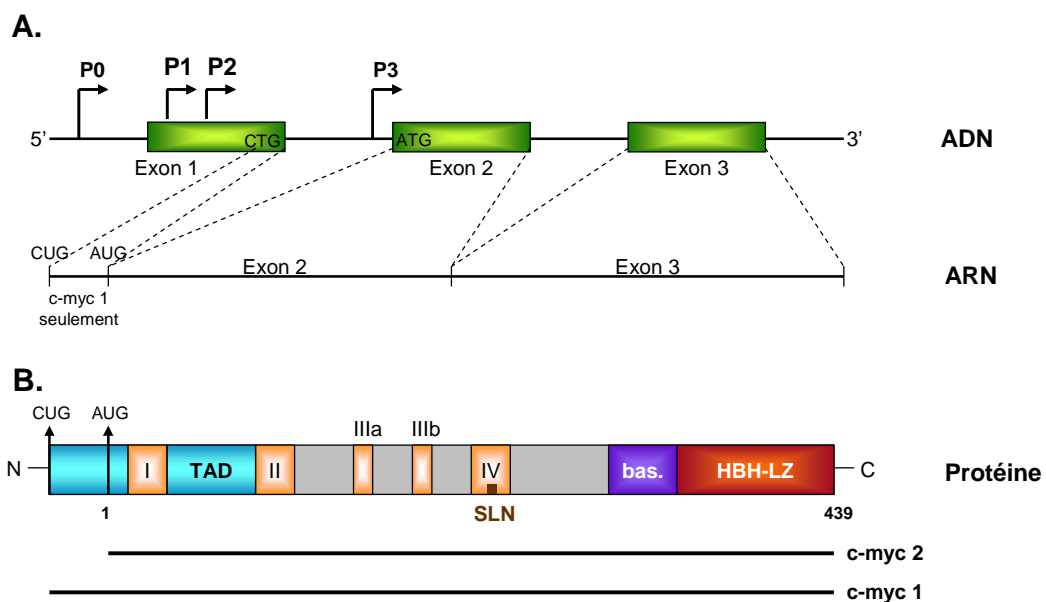


Figure 20. La structure du gène *c-myc* (A) et les différentes régions de la protéine humaine (B).

A. Les promoteurs sont signalés par des flèches noires courbées surmontées de P0, P1, P2 et P3. Les sites d'initiation de la traduction sont également précisés (CTG et ATG). Le schéma du transcrit mature est représenté (d'après Ryan et Birnie, 1996). B. Les deux sites d'initiation de la traduction sont rappelés par des flèches noires verticales. Le premier résidu d'acide aminé (1) et le dernier (439) sont signalés sous le schéma. Des lignes horizontales indiquent la longueur et la composition des deux variants *c-myc* (*c-myc 1* et *c-myc 2*). D'après Meyer et Penn, 2008 ; Ryan et Birnie, 1996.

2.1.3. Régulation de l'expression et de l'activité de *c-myc*

L'expression et l'activité de *c-myc* sont corrélées au potentiel prolifératif de la cellule. Elles sont finement régulées pour permettre une expression rapide et efficace au moment opportun, en

Contexte bibliographique

réponse aux signaux internes et externes (pour revues : Facchini et Penn, 1998 ; Hann, 2006 ; Wierstra et Alves, 2008). c-myc est soumise à deux niveaux de régulation :

- une régulation transcriptionnelle : une multitude de voies de signalisation ciblent c-myc, impliquant aussi bien des régulateurs positifs que négatifs. c-myc peut également réprimer son propre promoteur ;
- une régulation post-traductionnelle, assurée par des mécanismes directs, comme les phosphorylations, glycosylations ou ubiquitinations, ou par des mécanismes indirects, comme l'interaction avec des partenaires qui vont moduler son activité.

2.2. L'activité de c-myc

c-myc peut agir comme un facteur de transcription (pour revues : Adhikary et Eilers, 2005 ; Cole et Cowling, 2008 ; Cowling et Cole, 2006 ; Grandori et *al.*, 2000 ; Klapproth et Wirth, 2010 ; Meyer et Penn, 2008 ; Ryan et Birnie, 1996). Pour se lier à l'ADN et assurer cette fonction, elle doit interagir avec un partenaire de dimérisation : max, une petite protéine qui contient également un domaine hélice-boucle-hélice basique et un motif *leucine zipper*. L'interaction c-myc-max est assurée par les domaines hélice-boucle-hélice-*leucine zipper* de chaque protéine. L'hétérodimère c-myc-max présente une affinité particulière pour la séquence consensus CACGTG ou CATGTG, appelée boîte E (*E-box*), mais peut également se lier à des séquences variantes (Blackwell et *al.*, 1993). L'affinité de l'hétérodimère pour une boîte E serait modulée par l'environnement transcriptionnel local (Grandori et *al.*, 2000).

2.2.1. L'activation transcriptionnelle

Le complexe c-myc-max peut stimuler la transcription de ses gènes cibles par plusieurs mécanismes (pour revues : Adhikary et Eilers, 2005 ; Cowling et Cole, 2006 ; Klapproth et Wirth, 2010 ; Meyer et Penn, 2008). D'une façon générale, il recrute des co-facteurs au niveau des promoteurs, qui à leur tour régulent la transcription par des mécanismes différents. c-myc peut interagir :

- avec TRRAP ce qui lui permet de recruter des complexes d'acétylation des histones (GCN5, TIP60), qui vont favoriser la transcription (**Figure 21**) ;
- avec le complexe SWI/SNF (*switch/sucrose non fermentable*) de remodelage de la chromatine (Cheng et *al.*, 1999).

- avec CBP (*CREB [cAMP response element]-binding protein*) et p300, deux protéines qui possèdent une activité HAT (histone acétyltransférase) intrinsèque, et s'associent également à d'autres enzymes HAT (Vervoorts et *al.*, 2003) (**Figure 21**).

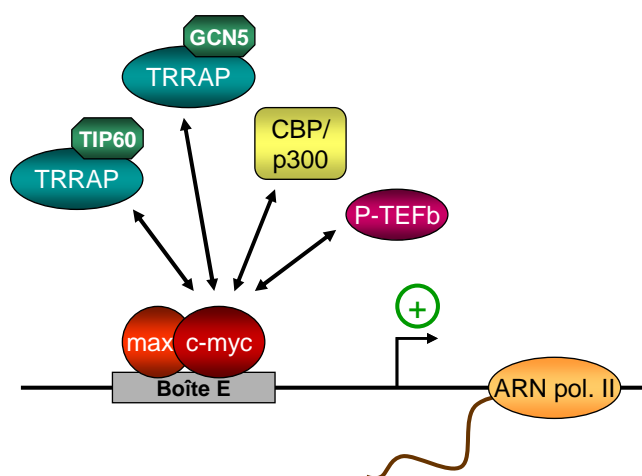


Figure 21. Activation transcriptionnelle par le complexe c-myc-max et ses partenaires coopératifs. D'après Adhikary et Eilers, 2005 ; Cowling et Cole, 2006 ; Klapproth et Wirth, 2010.

c-myc intervient aussi en aval du recrutement de l'ARN polymérase II pour augmenter la transcription (Bouchard et *al.*, 2004 ; Cole et Cowling, 2008 ; Eberhardy et Farnham, 2001, 2002) et elle peut s'associer à la sous-unité Skp2 de l'ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, qui peut se comporter comme un co-activateur (Kim et *al.*, 2003 ; von der Lehr et *al.*, 2003).

2.2.2. La répression transcriptionnelle

c-myc peut aussi agir comme un répresseur transcriptionnel. Les mécanismes moléculaires de la répression sont moins bien compris. Dans ce cas, c-myc est indirectement recrutée aux promoteurs par des interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription (pour revues : Adhikary et Eilers, 2005 ; Gartel et Shchors, 2003 ; Klapproth et Wirth, 2010 ; Meyer et Penn, 2008 ; Wanzel et *al.*, 2003).

La répression transcriptionnelle c-myc-dépendante requiert également, dans la plupart des cas, l'hétérodimère c-myc-max. La protéine max se lie aux régions régulatrices réprimées avant le recrutement de c-myc (Mao et *al.*, 2003 ; Si et *al.*, 2010). Le complexe c-myc-max se lie à des co-activateurs transcriptionnels directement liés à l'ADN dans le promoteur des gènes cibles, tels que NFY (*nuclear factor Y*), Sp1 (*specificity protein 1*), Miz-1 (*myc-interacting zinc finger 1*), YY1 (*yin-yang 1*) ou TFII-I (*transcriptional factor II-I*). Grâce à cette interaction, c-myc déplacerait d'autres co-activateurs normalement nécessaires à l'expression des gènes (par exemple p300) et établirait la répression (Adhikary et *al.*, 2005 ; Gartel et Shchors, 2003 ; Mao et *al.*, 2004 ; Wanzel et *al.*, 2003).

Contexte bibliographique

Parallèlement, c-myc peut recruter des enzymes de modification de la chromatine, comme la méthyltransférase DNMT3a, et induire une configuration répressive (Brenner et *al.*, 2005) (**Figure 22**).

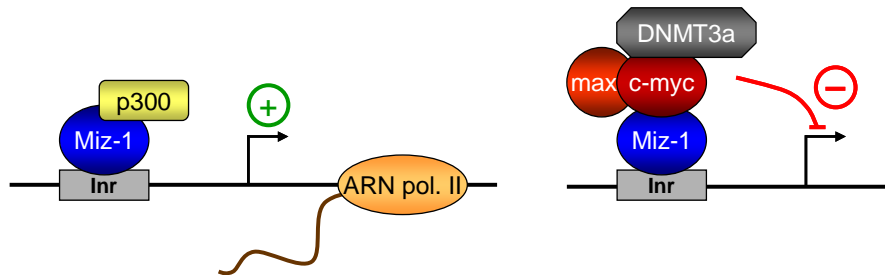


Figure 22. Répression transcriptionnelle par le complexe c-myc-max.

Les promoteurs de certains gènes ne contiennent pas de boîte TATA, mais possèdent à la place l'élément initiateur Inr, défini par le consensus faible YYCAYYYYY (où Y est une base pyrimidique). c-myc réprime certains gènes avec une séquence Inr dans leur promoteur. Par exemple, c-myc-max peut être impliqué dans un complexe ternaire avec Miz-1. Miz-1 libre se fixe au promoteur du gène réprimé par c-myc et active sa transcription. Mais par son interaction avec Miz-1, c-myc est recrutée au niveau du promoteur et réprime la transcription. D'après Adhikary et Eilers, 2005 ; Klapproth et Wirth, 2010.

2.2.3. Hormis la transcription ?... c-myc, réplication et traduction

c-myc est directement impliquée dans le processus de réplication de l'ADN et s'associe aux composants du complexe pré-répliatif. Elle participe au contrôle de l'initiation de la réplication en stimulant l'activité des origines de réplication (Dominguez-Sola et *al.*, 2007). En outre, c-myc est capable de réguler directement la traduction d'ARNm spécifiques en favorisant la méthylation de la guanine 5', ou coiffe (*cap*), qui est indispensable pour la traduction des gènes. c-myc, *via* son domaine de transactivation, serait recrutée à ses promoteurs cibles par des cofacteurs, eux-mêmes préalablement recrutés par d'autres facteurs de transcription. c-myc est donc capable d'augmenter directement et rapidement la quantité de protéine codée par ses gènes cibles (Cowling et Cole, 2007, 2010).

2.3. Les fonctions de c-myc

c-myc est une protéine multifonctionnelle. Elle présente deux facettes (le « Yin et le Yang », d'après Larsson et Henriksson) : elle possède d'un côté des fonctions oncogéniques qui accélèrent le développement de tumeurs, et de l'autre des fonctions protectrices qui activent une réponse anti-tumeur. Au cours de la tumorigenèse induite par *c-myc*, les mutations secondaires qui désorganisent les composants du programme de suppression de tumeur seront sélectionnées (pour revues : Dang et *al.*, 2006 ; Grandori et *al.*, 2000 ; Klapproth et Wirth, 2010 ; Larsson et Henriksson, 2010 ; Meyer

et Penn, 2008 ; Oster et *al.*, 2002 ; Pelengaris et Khan, 2003 ; Pelengaris et *al.*, 2002a ; Vita et Henriksson, 2006).

2.3.1. Le cycle cellulaire, la prolifération et la croissance

c-myc joue un rôle important dans la transition de la phase G0 jusqu'à la phase S du cycle cellulaire. *c-myc* est un gène de réponse rapide de croissance exprimé après stimulation par des mitogènes. Il permet à la cellule de parcourir la phase G1. Les régulateurs du cycle cellulaire (cyclines, CDK, CKI, ubiquitine ligases ciblant les CKI, protéines de réplication...) sont des cibles de c-myc. c-myc induit l'activation directe ou indirecte des gènes des cyclines D1, D2, E et A, de CDK4 et de CDC25A. Elle inhibe par ailleurs *gadd45* et *gadd153*, qui codent des facteurs impliqués dans les points de contrôle du cycle, ainsi que les inhibiteurs de CDK *p15*, *p21* et *p27*. Elle stimule donc la progression du cycle cellulaire (Dang et *al.*, 2006 ; Grandori et *al.*, 2000 ; Oster et *al.*, 2002). En outre, c-myc est directement impliquée dans la réplication de l'ADN cellulaire (Dominguez-Sola et *al.*, 2007 ; et *cf. supra*).

c-myc augmente également le potentiel prolifératif des cellules en favorisant la croissance cellulaire (augmentation de la masse et de la taille) : elle fournit à la cellule des réserves de « matériaux » importants et augmente son métabolisme et sa synthèse protéique (Arabi et *al.*, 2005 ; Gomez-Roman et *al.*, 2003 ; Grandori et *al.*, 2005 ; Grewal et *al.*, 2005 ; Schmidt, 2004 ; et pour revue, Dang et *al.*, 2006).

2.3.2. La différenciation et la pluripotentialité

c-myc joue un rôle important dans la régulation des propriétés des cellules souches et du phénomène de différenciation. Dans la majorité des cas, l'expression de *c-myc* est associée à une inhibition de la différenciation. Le plus souvent, la répression de *c-myc* fait partie intégrante du programme de différenciation (Meyer et Penn, 2008 ; Oster et *al.*, 2002 ; Pelengaris et *al.*, 2002a).

En collaboration avec d'autres facteurs de transcription typiques des cellules souches (Klf4, Oct4, Sox4), c-myc peut convertir des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes (pour revue, Larsson et Henriksson, 2010). c-myc semble capable de maintenir des « cellules souches cancéreuses » qui constitueraient une sous-population de cellules dotées de capacité d'auto-renouvellement, semblable à des cellules souches, au sein de la population tumorale (Larsson et Henriksson, 2010 ; Shackleton et *al.*, 2009).

Contexte bibliographique

2.3.3. L'instabilité génomique

c-myc affecterait la stabilité du génome (pour revues : Meyer et Penn, 2008 ; Oster et *al.*, 2002 ; Prochownik et Li, 2007). En effet, la surexpression de *c-myc* induit à certains loci des amplifications géniques ou des réarrangements, intra- ou extra-chromosomiques (Kuschak et *al.*, 1999 ; Mai et *al.*, 1996a, 1996b, 1999 ; Taylor et Mai, 1998). La surexpression de *c-myc* accélère la prolifération et écourt la période de détection et de réparation des dommages potentiels à l'ADN, avant sa duplication. Des mutations peuvent se produire et permettre à la cellule de résister à l'apoptose, et de subir une transformation néoplasique (Mai et *al.*, 1999). c-myc abroge les points de contrôle au niveau des phases G1 et S, qui surveillent les dommages à l'ADN (Felscher et Bishop, 1999b). En outre, l'expression ectopique de *c-myc* inhibe le point de contrôle du fuseau mitotique en phase G2/M⁶, provoque le découplage de la réplication de l'ADN et de la mitose et favorise ainsi la polyploïdie (Li et Dang, 1999). c-myc crée un stress réplicatif (Prochownik et Li, 2007). La perte de p53 (Yin et *al.*, 1999) ou la surexpression de Bcl-xL (Minn et *al.*, 1996) coopèrent et ont un effet synergique pour faciliter la déstabilisation du génome.

c-myc provoque également, directement, des changements métaboliques dans la cellule, qui génèrent des lésions de l'ADN : elle stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène (Prochownik et Li, 2007) et crée aussi un stress réplicatif (dû à son rôle direct dans la réplication de l'ADN) (Dominguez-Sola et *al.*, 2007 ; Cole et Cowling, 2008), deux phénomènes qui lèsent l'ADN. *c-myc* peut contourner et ignorer les différents niveaux de sécurité et points de contrôle de la cellule, amplifiant l'instabilité génomique. Des clones p53-déficients émergent fréquemment dans les tumeurs surexprimant *c-myc*, ce qui illustre le rôle protecteur de la signalisation par p53 dans la tumorigenèse induite par *c-myc*, et la pression de sélection exercée sur les tumeurs pour s'affranchir de la réponse p53 (Capoulade et *al.*, 1998 ; Eischen et *al.*, 1999 ; Lindström et *al.*, 2001 ; Schmidt et *al.*, 1999 ; Wilda et *al.*, 2004).

2.3.4. L'adhésion cellulaire et l'angiogénèse

L'activation de *c-myc* facilite l'angiogénèse, ou néovascularisation, processus essentiel pour assurer la croissance des tumeurs et leur grossissement, notamment en leur permettant de lutter contre l'hypoxie (Janz et *al.*, 2000 ; Ngo et *al.*, 2000 ; Pelengaris et *al.*, 1999, 2002b ; Semenza, 2002). L'angiogénèse est un événement précoce dans la lymphomagenèse induite par *c-myc*, et contribuerait

⁶ Il existe un point de contrôle mitotique qui surveille l'état du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes. En cas de rupture du fuseau, la cellule est immédiatement bloquée en métaphase. Lorsqu'une cellule échappe malgré tout à l'arrêt mitotique, l'échec de la ségrégation chromosomique ou l'absence de cytokinèse émettent un signal qui stoppe la progression de la phase G1 suivante (arrêt de la transition G1-S), pour tenter de réparer les lésions.

significativement à sa rapidité (Brandvold et *al.*, 2000). Un modèle totalement différent a été proposé, dans lequel la surexpression de *c-myc* s'oppose au développement tumoral dans une lignée de cancer du poumon et s'accompagne d'une répression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Barr et *al.*, 2000). La fonction de *c-myc* dans la modulation de l'angiogenèse dépendrait du micro-environnement trophique des cellules et des caractéristiques de chaque type cellulaire (pour revue, Oster et *al.*, 2002).

2.3.5. L'apoptose

Les mutations oncogéniques ont un effet double sur les cellules : d'une part, elles favorisent le développement du cancer en augmentant la prolifération ou la survie, d'autre part, elles mettent en place des réponses compensatrices comme l'apoptose ou la sénescence (Campaner et *al.*, 2010b). *c-myc* est un régulateur général de l'apoptose et sensibilise les cellules à l'apoptose (Askew et *al.*, 1991 ; Evan et *al.*, 1992 ; Shi et *al.*, 1992). Les mécanismes exacts par lesquels *c-myc* induit l'apoptose sont mal connus. Néanmoins, deux voies de signalisation principale ont été caractérisées :

- *c-myc* induit directement l'expression de p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'homme), et indirectement, par ses effets génotoxiques, stimule ATM (*cf. supra*), qui activent ensuite p53. L'importance des voies ATM/ARF-MDM2-p53 dans l'apoptose dépendante de *c-myc* est illustrée par son altération dans la tumorigenèse, et notamment la lymphomagenèse, induites par *c-myc* : la perte de fonction des suppresseurs de tumeur impliqués dans cette signalisation accélère la tumorigenèse et contribue au phénotype malin (Alt et *al.*, 2003 ; Bertwistle et Sherr, 2007 ; Bouchard et *al.*, 2007 ; Capoulade et *al.*, 1998 ; Dickins et *al.*, 2005 ; Eischen et *al.*, 1999 ; Finch et *al.*, 2006 ; Griesmann et *al.*, 2009 ; Hsu et *al.*, 1995 ; Jacobs et *al.*, 1999 ; Lindström et *al.*, 2001 ; Pusapati et *al.*, 2006 ; Schmidt et *al.*, 1999 ; Sluss et *al.*, 2010 ; Wilda et *al.*, 2004) ;
- *c-myc* inhibe l'expression des facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) (Eischen et *al.*, 2001).

La capacité de *c-myc* d'induire l'apoptose fournit un mécanisme de sécurité vis-à-vis de l'oncogenèse et de la transformation (Pusapati et *al.*, 2006 ; Sluss et *al.*, 2010). L'annulation de cette fonction, à la suite de mutation secondaires coopératives, est une étape importante de la transformation cellulaire et de l'émergence de tumeurs clonales (Eischen et *al.*, 2001).

2.3.6. La sénescence... et l'immortalité

Outre l'apoptose, *c-myc* peut aussi induire, moins fréquemment, la sénescence, en réponse aux stress réplicatif ou oxydatif qu'il occasionne (Campaner et *al.*, 2010a ; Grandori et *al.*, 2003). La

Contexte bibliographique

sénescence *c-myc*-dépendante implique les voies de signalisation ARF-p53-p21 et p16-pRb. La lymphomagenèse est retardée dans des souris E μ -*c-myc* qui expriment une protéine p53 mutante incapable d'induire l'apoptose, mais toujours capable d'induire la sénescence (Campaner et *al.*, 2010b ; Post et *al.*, 2010).

Inversement, *c-myc* est aussi capable d'inhiber la sénescence cellulaire (pour revues : Campaner et *al.*, 2010b ; Hydbring et Larsson, 2010a, 2010b ; Larsson et Henriksson, 2010). D'une part, *c-myc* réprime la sénescence répllicative (due à l'érosion des télomères) (Feldser et Greider, 2007 ; Xu et *al.*, 2001). D'autre part, *c-myc* inhibe la sénescence induite par les oncogènes (Hydbring et *al.*, 2010 ; Zhuang et *al.*, 2008 ; et pour revue, Hydbring et Larsson, 2010a). Dans différents types de cancers, l'inactivation de *c-myc* aboutit à une régression des tumeurs associée à la réactivation de la sénescence (Wu et *al.*, 2007).

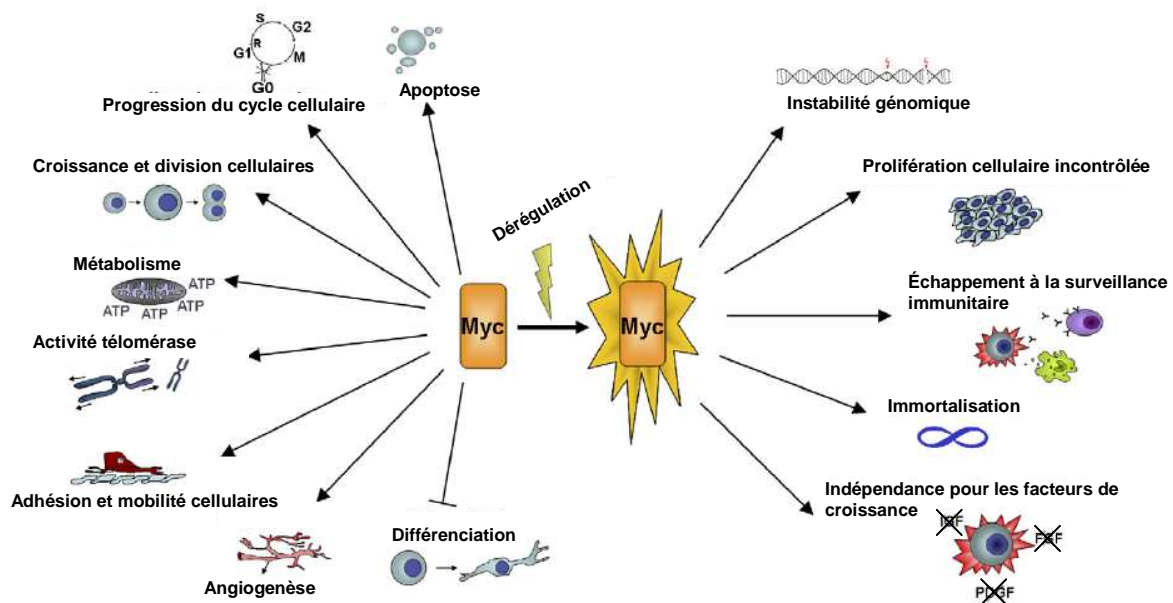


Figure 23. Les phénomènes et mécanismes cellulaires contrôlés par *c-myc* en conditions physiologiques normales (gauche) et au cours de la tumorigenèse (droite).

Schéma de synthèse. D'après Vita et Henriksson, 2006. Voir aussi table 1, Meyer et Penn, 2008, p 982.

2.4. Le rôle de *c-myc* dans l'oncogenèse et la lymphopathogenèse

Près de 70 % des tumeurs humaines présentent une forte expression de *c-myc* et la suppression de cette surexpression peut favoriser la régression des tumeurs (Cole et Cowling, 2008). En effet, *c-myc* est activé dans une multitude de néoplasies lymphoïdes et de tumeurs solides agressives chez l'homme (pour revues : Albiñ et *al.*, 2010 ; Nesbit et *al.*, 1999). Plusieurs mécanismes peuvent créer des altérations oncogéniques de *c-myc* et favoriser la tumorigenèse : des mutations ponctuelles, des amplifications géniques, des translocations chromosomiques, la

surexpression (qui peut être une conséquence des phénomènes précédents), l'augmentation de la traduction, l'accroissement de la stabilité de la protéine... (Meyer et Penn, 2008 ; Vita et Henriksson, 2006). L'expression dérégulée de *c-myc* seule ne suffit pas à transformer une cellule en cellule tumorale : des mutations additionnelles coopératives sont nécessaires à l'émergence de tumeurs, par exemple dans la voie de signalisation par ras (*cf. infra*) (Adhikary et Eilers, 2005). D'autres altérations sont nécessaires, en plus de l'activation d'oncogènes, comme l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (p53, pRb...) ou l'acquisition de la capacité de proliférer sans limite (activation de hTERT) (Albiñ et *al.*, 2010). Nous limitons notre étude à la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante.

2.4.1. La transformation cellulaire par c-myc

Deux types de mécanismes permettent de déjouer la transformation cellulaire par *c-myc* : d'une part le contrôle post-transcriptionnel de *c-myc* par la voie Ras et d'autre part divers mécanismes de sécurité intrinsèques (pour revue, Adhikary et Eilers, 2005). Le contrôle ras-dépendant de la protéine *c-myc* revêt trois aspects principaux :

- le contrôle de la stabilité et de la demi-vie par la phosphorylation de la Ser62 (stabilisatrice) ou de la Thr58 (déstabilisatrice) ;
- la co-régulation des gènes cibles de *c-myc* impliqués dans la prolifération par les facteurs de transcription de la famille Foxo ;
- la répression transcriptionnelle par *c-myc* est favorisée par la phosphorylation de *c-myc* (Ser71) par la voie PI3 kinase (activée par ras).

En outre, les capacités de *c-myc* d'induire l'apoptose et la sénescence protègent aussi la cellule de la transformation et limitent la tumorigenèse. Ces mécanismes de sécurité doivent être inactivés pour permettre la formation de tumeurs. Par ailleurs, la protection exercée par ras explique pourquoi l'altération d'oncogènes impliqués dans la signalisation ras-dépendante coopère avec *c-myc* dans la tumorigenèse (Adhikary et Eilers, 2005). De plus, *c-myc* induit des modifications de la chromatine et établit un statut d'euchromatine active. Ce type de changement de l'état de modification des histones est fréquemment associé à la tumorigenèse (Varlakhanova et Knoepfler, 2009).

2.4.2. La translocation de c-myc dans le locus *IgH* et sa dérégulation

La translocation de *c-myc* dans les loci d'immunoglobuline est la caractéristique génétique de néoplasies des lymphocytes B et des plasmocytes dans trois espèces de mammifères : le lymphome de Burkitt chez l'homme (pour revues : Blum et *al.*, 2004 ; Perkins et Friedberg, 2008), le plasmocytome chez la souris et l'immunocytome chez le rat. Il s'agit d'une translocation réciproque

Contexte bibliographique

équilibrée (*cf.* chapitre 2), qui juxtapose *c-myc* à un/des activateurs forts d'immunoglobuline en *cis*. C'est principalement le locus *IgH* qui est ciblé (**Tableau 3**). L'allèle *c-myc* réarrangé est transcriptionnellement actif, tandis que l'allèle germinale est silencieux, comme dans les cellules B matures normales (pour revue, Janz, 2006).

Tableau 3. Translocations chromosomiques dérégulant l'expression de *c-myc* dans trois espèces de mammifères (homme, souris, rat). D'après Janz, 2006.

Espèce, tumeur	Translocation	Réarrangement	Fréquence (%)
Homme, lymphome de Burkitt	t(8;14)	c-myc-IgH	80
Homme, lymphome de Burkitt	t(2;8)	Igκ-c-myc	15
Homme, lymphome de Burkitt	t(8;22)	c-myc-Igλ	5
Souris, plasmocytome	t(12;15)	IgH-c-myc	90
Souris, plasmocytome	t(6;15)	Igκ-c-myc	10
Souris, plasmocytome	t(15;16)	c-myc-Igλ	<1
Rat, immunocytome	t(6;7)	IgH-c-myc	100

Ces translocations et anomalies de l'expression de *c-myc* qui caractérisent le lymphome de Burkitt ou le plasmocytome ne sont toutefois pas pathognomoniques. En effet, elles sont aussi observées, de façon peu commune, dans d'autres types de désordres lymphoprolifératifs : le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome folliculaire, le lymphome du manteau, le myélome multiple, le lymphome plasmoblastique, la leucémie lymphoïde chronique, également des lymphomes T... Dans ces cas, la dérégulation de *c-myc* n'a qu'une valeur pronostic, alors qu'elle a une véritable valeur diagnostic lors du lymphome de Burkitt. En effet, contrairement au lymphome de Burkitt, la dérégulation de *c-myc* dans les autres lymphomes est associée à des caryotypes complexes et à d'autres lésions coopératives, qui établissent les différences cliniques entre les classes de lymphomes. Les lymphomes non Burkitt surexprimant *c-myc* sont cliniquement plus agressifs, davantage résistants aux traitements standards et de pronostic défavorable. Très souvent, le lymphome possède déjà une première lésion génétique, et la translocation de *c-myc* constitue une lésion secondaire qui accentue une pathologie pré-existante et induit la transformation clinique vers une forme plus agressive (pour revues : Boxer et Dang, 2001 ; Janz, 2006 ; Smith et *al.*, 2010).

3. p53

p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeur⁷ capable de coordonner les réponses cellulaires à une grande variété de signaux de stress, potentiellement oncogéniques. Par son rôle capital dans la surveillance de la cellule, la détection des anomalies, le maintien de l'intégrité cellulaire et la suppression de la cancérisation, il est assimilé à une « sentinelle du génome » (Lane, 1992), un « gardien de la cellule » (Levine, 1997) et un « gendarme des oncogènes » (Efeyan et Serrano, 2007).

3.1. Le gène et la protéine

La protéine p53 est codée par le gène *p53*, ou *TP53*, localisé sur le bras court du chromosome 17 chez l'homme (17p13.1) (Isobe et *al.*, 1986). Il est composé de 19 198 nucléotides répartis en onze exons. La séquence codante s'étend du deuxième au dernier exon. Le premier exon (non codant) est séparé du groupe des dix autres exons par un gros intron de 10 kb (Belyi et *al.*, 2010 ; Prokocimer et *al.*, 1994). La famille génique *p53* contient aussi deux autres gènes apparentés : *p63* et *p73*. Les protéines correspondantes possèdent quelques fonctions redondantes avec p53, ainsi que des fonctions spécifiques (Ortt et Sinha, 2006 ; Smeenk et *al.*, 2008 ; Tozluoğlu et *al.*, 2008 ; Viganò et *al.*, 2006 ; et pour revues : Bourdon, 2007 ; Khoury et Bourdon, 2010 ; Murray-Zmijewsky et *al.*, 2006)

La structure de p53 reflète sa complexité fonctionnelle (pour revues : Bode et Dong, 2004 ; Joerger et Fersht, 2008 ; Okorokov et Orlova, 2009). C'est un polypeptide de 393 résidus chez l'homme, de 53 kDa, subdivisé en plusieurs domaines (**Figure 24**) :

- une région N-terminale acide (résidus 1 à 98) : Elle comporte un domaine TAD formé de deux sous-domaines : TAD1 (résidus 1 à 40) et TAD2 (résidus 41 à 67), suivis d'une région riche en proline (résidus 68 à 98). Le TAD est le domaine d'interaction de p53 avec de nombreuses protéines régulatrices : des facteurs de la machinerie transcriptionnelle, les coactivateurs transcriptionnels p300/CBP et les régulateurs négatifs MDM2 (*murine double minute 2*) et MDMX (également appelé MDM4).
- un domaine de liaison à l'ADN, ou domaine de cœur de p53 (p53C) en position centrale (résidus 99 à 303) ;

⁷ Un gène suppresseur de tumeur, ou anti-oncogène, est un gène qui, lorsqu'il n'est plus exprimé, ou lorsque son produit est inactivé, prédispose la cellule au développement d'une tumeur. C'est un inhibiteur de croissance cellulaire. En son absence, il manque un signal de non-prolifération cellulaire.

Contexte bibliographique

- une région C-terminale, contenant un signal de localisation nucléaire SLN (résidus 304 à 323), un domaine d'oligomérisation (résidus 324 à 363), et un domaine C-terminal régulateur basique (résidus 364 à 393). Celui-ci est notamment un point chaud de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, ubiquitination, sumoylation⁸, neddylation⁹) qui permettent de réguler la fonction et le taux protéique de p53 dans la cellule (pour revues : Beckerman et Prives, 2010 ; Joerger et Fersht, 2008 ; Laptenko et Prives, 2006).

La protéine est présente essentiellement sous forme tétramérique *in vitro* et *in vivo* (Friedman et al., 1993 ; Wang et al., 1994).



Figure 24. Les différents domaines structuraux de la protéine p53.

TAD : domaine d'activation transcriptionnelle. Pro : région riche en proline. p53C : domaine de liaison à l'ADN. SLN : séquence de localisation nucléaire. Oligo. : domaine d'oligomérisation (tétramérisation). C-term. : domaine C-terminal. La position des acides aminés délimitant ces différents domaines (chez l'homme) est précisée sous le schéma. D'après Joerger et Fersht, 2008, Okorokov et Orlova, 2009.

3.2. Le contrôle de la transcription par p53

La capacité de p53 de réguler la transcription de multiples gènes en réponse à différents signaux génotoxiques est au centre de sa fonction de gène suppresseur de tumeur. La réponse génomique de p53 aux stress cellulaires est orchestrée par sa liaison à l'ADN, suivie par l'activation ou l'inhibition de l'activité du promoteur des gènes. Toutefois, p53 assure également des fonctions indépendantes de la transcription (Baptiste et Prives, 2004 ; Green et Kroemer, 2009 ; Marchenko et Moll, 2007 ; Speidel, 2010 ; Vousden et Lane, 2007).

3.2.1. Les mécanismes de la transcription régulée par p53

p53 est impliquée dans l'initiation de la transcription. Elle favorise la modification des histones et la création d'une structure chromatinienne « ouverte » et permissive. Elle est par exemple impliquée dans le déplacement et le retrait du variant d'histone H2A.Z qui constitue une barrière répressive à l'activation de *p21* (Gévry et al., 2007). p53 recrute aussi les histone méthyltransférases CARM1 et PRMT1 et favorisent leur coopération et leur synergie avec l'histone acétyltransférase p300/CBP pour faciliter la transcription (An et al., 2004). Enfin, p53 recrute des histones

⁸ Modification post-traductionnelle du même type que l'ubiquitination, qui permet de fixer des protéines SUMO sur des résidus lysines (Mahajan et al., 1997 ; Matunis et al., 1996).

⁹ Comme la sumoylation, la neddylation est une modification post-traductionnelle semblable à l'ubiquitination. Elle consiste à fixer sur une protéine un polypeptide appelé Nedd8 (Gong et Yeh, 1999).

acétyltransférases (p300/CBP, pCAF, GCN5, TIP60). Après modification et remodelage de la chromatine, p53 participe aussi au recrutement de certains composants du complexe de pré-initiation et à leur assemblage (pour revue, Beckerman et Prives, 2010).

p53 interagit ensuite avec plusieurs facteurs d'élongation qui facilitent la processivité de la polymérase et s'opposent à son arrêt (CDK9, FACT, divers constituants du complexe du médiateur, ELL). Chez la levure, p53 a été montrée comme un véritable facteur d'élongation guidant la polymérase à travers les régions codantes (Balakrishnan et Gross, 2008). De nombreux travaux ont récemment illustré l'implication de p53, et de la signalisation en amont, dans la régulation (y compris négative) de l'élongation de la transcription (pour revue, Beckerman et Prives, 2010).

p53 peut aussi agir comme un répresseur transcriptionnel de gènes impliqués dans la prolifération ou la transformation maligne (environ 15 % des gènes cibles). Plusieurs mécanismes ont été proposés. Par exemple, elle recruterait un corépresseur, qui se lierait ensuite à un facteur de modification de la chromatine (répression directe), stimulerait l'expression d'une protéine répressive, par exemple p21 (répression indirecte), ou entrerait en compétition avec d'autres facteurs de transcription pour des sites de liaison adjacents (pour revues : Beckerman et Prives, 2010 ; Laptenko et Prives, 2006 ; Menendez et *al.*, 2009 ; Riley et *al.*, 2008). En plus de son effet sur les gènes transcrits par l'ARN polymérase II, p53 réprime aussi les promoteurs transcrits par les ARN polymérases I et III, ciblant ainsi les composants de la machinerie de synthèse des protéines (pour revues : Beckerman et Prives, 2010 ; Laptenko et Prives, 2006).

3.2.2. Régulation de p53 et modulation de l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à p53

Un certain nombre de paramètres influent sur l'effet biologique de p53 et ses conséquences dans la suppression de tumeur. Ils modulent notamment la discrimination entre la multitude de promoteurs cibles en réponse aux stimuli variés. D'une part, la séquence des sites de liaison de p53 à l'ADN, dans les promoteurs des gènes cibles, agit sur la flexibilité et la courbure de l'ADN, et sur l'affinité de liaison et la stabilité de p53. La liaison serait d'autant plus affine que la région est flexible. Une autre hypothèse suggère que la liaison optimale a lieu lorsque les deux régions du site de liaison sont alignées sur la même face de la double hélice (alignement stéréospécifique) (pour revues : Beckerman et Prives, 2010 ; Menendez et *al.*, 2009 ; Riley et *al.*, 2008).

D'autre part, p53 est sujette à des modifications post-traductionnelles sur une multitude de sites (**Figure 25**). De nombreux sites de phosphorylation sont présents dans le domaine d'activation

Contexte bibliographique

N-terminal et dans le domaine régulateur C-terminal. La phosphorylation a longtemps été considérée comme une étape cruciale dans la stabilisation de p53. Néanmoins, celle-ci nécessiterait un réseau plus complexe et sophistiqué de modifications. L'acétylation de p53 est aussi associée à son activation et sa stabilisation, et serait essentielle au recrutement efficace de ses cofacteurs et à l'activation de ses gènes cibles *in vivo*. De plus, elle exclut l'ubiquitination sur les mêmes sites et inhibe la formation de complexes répresseurs incluant MDM2/MDMX (ou leurs homologues humaines HDM2/HDMX [*human double minute*]) aux promoteurs des gènes cibles. p53 peut aussi être méthylée, sumoylée (la sumoylation participerait à la régulation de l'activité et de la localisation de p53) et neddylée (rôle encore indéfini). Il n'existe apparemment (pour l'instant) aucune modification précise sur un site particulier qui servirait de commutateur pour la stabilité et l'activité transcriptionnelle de p53. Différents types de modifications sur différents sites permettraient de façonner l'activité de p53 et de réguler sa fonction. La diversité des combinaisons possibles des différentes modifications agirait comme un « code-barres » modulant des réponses p53 spécifiques (pour revues : Bode et Dong, 2004 ; Dai et Gu, 2010 ; Kruse et Gu, 2009 ; Meek et Anderson, 2009).

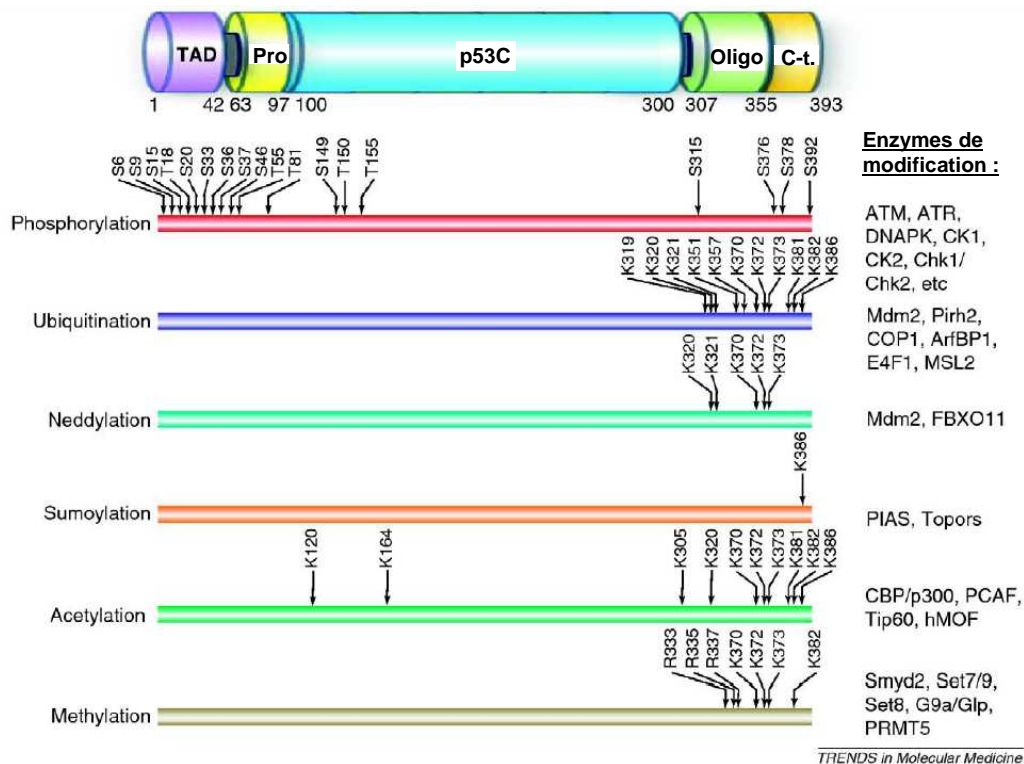


Figure 25. Les sites de modifications post-traductionnelles de p53.

Les enzymes responsables de chaque type de modification sont précisées sur la droite. D'après Dai et Gu, 2010.

Le niveau cellulaire de p53 est surtout régulé par sa dégradation protéosomale ubiquitine-dépendante. MDM2 (HDM2) est la principale ubiquitine ligase E3, et le principal régulateur négatif, de p53 ; d'autres ligases E3 peuvent également réguler la fonction de p53. La poly-ubiquitination

cible p53 pour sa dégradation protéosomale, tandis que la mono-ubiquitination (lorsque le niveau d'activité de MDM2 est plus faible) favorise sa translocation cytoplasmique. En plus de favoriser la dégradation de p53, MDM2 et MDMX forment des complexes protéiques avec p53 sur les promoteurs des gènes cibles. MDMX ne possède pas d'activité ligase intrinsèque pour p53, et réprime la transcription induite par p53 (pour revues : Dai et Gu, 2010 ; Kruse et Gu, 2009).

En outre, différents cofacteurs ont un impact sur le programme transcriptionnel de p53 : soit ils modifient la capacité de p53 de reconnaître certains éléments de réponse, soit ils agissent sur le recrutement de certains coactivateurs transcriptionnels à certains loci. Selon la gravité des dommages nécessitant une réponse p53, des partenaires différentiels seront recrutés pour orienter la réponse vers l'issue la plus appropriée et stimuler l'expression des gènes adaptés (pour revues : Beckerman et Prives, 2010 ; Kruse et Gu, 2009 ; Menendez et *al.*, 2009 ; Vousden et Prives, 2009). Enfin, la distance entre le site de liaison de p53 *in vivo* et le site d'initiation de la transcription influence la régulation des gènes cibles. Lorsque les deux sites sont éloignés, la transcription et l'expression du gène induites par p53 sont très faibles. Néanmoins, un site de liaison de p53 éloigné peut être rapproché du promoteur du gène cible par la formation de boucles d'ADN, en collaboration avec d'autres partenaires protéiques (pour revue : Riley et *al.*, 2008).

3.3. Activation de p53 (principes généraux)

Jusqu'à il y a peu, le modèle classique d'activation de p53 comportait les trois étapes suivantes : la stabilisation de p53 par phosphorylation catalysée par diverses kinases activées par les signaux de stress, la liaison séquence-spécifique de p53 à l'ADN et l'activation de gènes cibles par l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle (pour revue : Kruse et Gu, 2009). Devenu obsolète, il a été récemment réactualisé. Ce nouveau modèle suggère notamment que p53 peut se fixer à l'ADN en l'absence de signaux de stress, mais reste inactive, probablement du fait de la répression exercée par MDM2 et MDMX (HDM2 et HDMX/4 chez l'homme). Dans de nombreux cas, p53 est déjà fixée à ses promoteurs cibles sans induire la transcription, mais son acétylation peut augmenter et favoriser sa fixation à l'ADN au niveau de certains gènes cibles pro-apoptotiques spécifiques (pour revue : Kruse et Gu, 2009).

L'activation de p53 exige non seulement la stabilisation et l'activation par des modifications post-traductionnelles, mais également la libération de son état réprimé. En effet, p53 serait constitutivement active mais continuellement réprimée par MDM2 et MDMX. Cette répression doit être levée : c'est l'étape d'antirépression. Il existerait une interaction entre les modifications post-

Contexte bibliographique

traductionnelles de p53 qui l'activent par stabilisation et qui supprime sa répression. L'importance de l'antirépression est variable *in vivo*, en fonction de la capacité de réponse des promoteurs cibles de p53. L'antirépression seule serait suffisante pour l'activation des cibles de p53 hautement répondeuses (par exemple les gènes qui bloquent la progression du cycle cellulaire), mais insuffisante pour activer des cibles faiblement répondeuses, comme les gènes qui induisent l'apoptose. Dans ce second cas de figure, elle nécessite des modifications post-traductionnelles supplémentaires coopératives de p53. Dans cet exemple, un signal de stress produirait un arrêt réversible du cycle cellulaire, mais la réponse apoptotique irréversible et plus sévère requiert un signal additionnel de stimulation. Il existe donc une régulation différentielle de gènes cibles spécifiques. Une réponse globale est permise par la levée de la répression, et d'autres modifications augmentent ensuite l'activation de p53 pour induire les réponses cellulaires appropriées. Le modèle d'activation de p53 réactualisé comprend désormais les trois étapes suivantes : la stabilisation de p53, l'antirépression et l'activation (ou la répression) transcriptionnelle promoteur-spécifique (pour revues : Kruse et Gu, 2009 ; Zilfou et Lowe, 2009) (**Figure 26**).

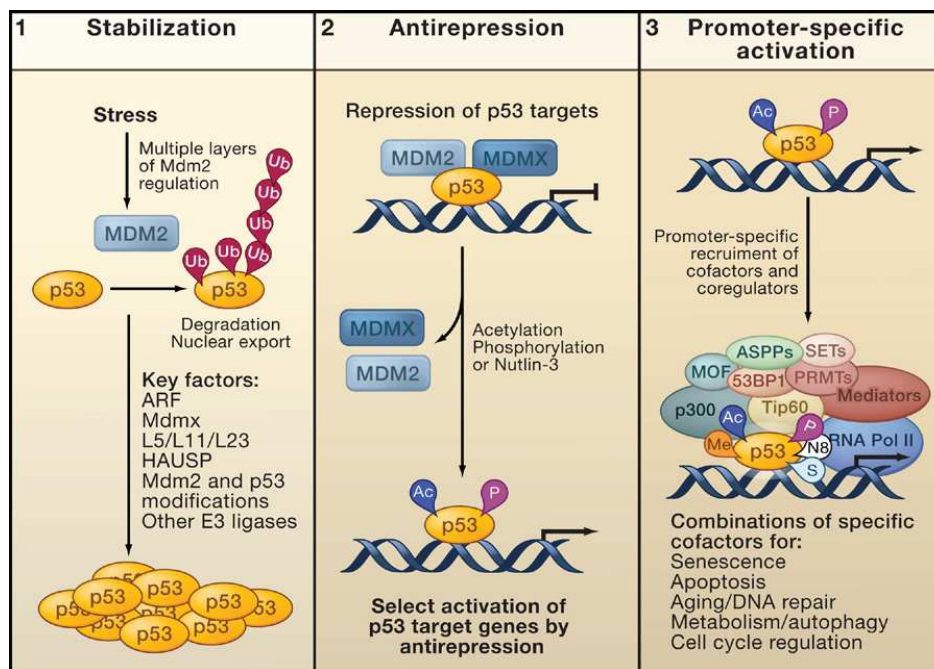


Figure 26. Le modèle actualisé de l'activation de p53.

L'activation de p53 *in vivo* nécessite trois étapes : (1) la stabilisation de p53, (2) l'antirépression et (3) l'activation transcriptionnelle spécifique du promoteur. (1) La stabilisation de p53 induite par le stress cellulaire se produit par différents mécanismes, dont la plupart agissent sur la capacité de MDM2 d'ubiquitiner p53. (2) L'antirépression correspond à la libération de p53 de la répression exercée par MDM2 et MDMX. Elle nécessite l'acétylation de p53 au niveau de certains résidus lysines et facilite l'activation de groupes spécifiques de cibles de p53. La phosphorylation de p53 ou le traitement avec la nutline-3 ont des effets semblables sur l'antirépression. (3) Pour activer pleinement les promoteurs spécifiques, p53 recrute et interagit avec de nombreux cofacteurs. Ils agissent en modifiant p53, les histones environnantes ou d'autres facteurs de transcription. La modulation de l'activation de groupes spécifiques de cibles de p53 impliqués dans ses différentes fonctions effectrices requiert des combinaisons exactes de cofacteurs et de modifications post-traductionnelles. Abréviations : Ac, acétylation ; P, phosphorylation ; Me, méthylation ; N8, neddylation ; S, sumoylation.

Extrait de Kruse et Gu, 2009.

3.4. Les fonctions suppressives de tumeur de p53

p53 est activée notamment en réponse aux dommages à l'ADN et à l'instabilité génomique inhérents à la progression tumorale. Le dénominateur commun aux différentes voies de la suppression de tumeur est la protection de l'organisme, soit en maintenant l'intégrité de la cellule et de son génome, soit en empêchant la propagation de cellules cancéreuses naissantes (pour revues : Meek, 2009 ; Zilfou et Lowe, 2009). L'importance de p53 dans le maintien de la stabilité du génome est révélée par la perte ou la mutation de son gène dans près de la moitié des tumeurs humaines (Goh et *al.*, 2011 ; Vousden et Lu, 2002).

3.4.1. Activation de la réponse p53 dans la suppression de tumeur

p53 peut être activée par la voie des dommages à l'ADN. Les cassures simple ou double brin dans l'ADN déclenchent la réponse aux dommages à l'ADN (**Figure 27**). Elles sont détectées par des complexes spécialisés qui recrutent et activent deux protéines kinases, ATM et ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*), au site de lésion. ATM assure la réponse immédiate aux cassures double-brin de l'ADN. ATR prend en charge les autres formes de dommages à l'ADN : stress répliatif, cassures simple-brin, réticulation de l'ADN (*DNA crosslinking*)... Elles phosphorylent l'histone H2AX. Au niveau des cassures double brin, γ H2AX (forme phosphorylée de H2AX) recrute des complexes ATM supplémentaires. Lors d'une cassure simple brin, la protéine RPA (*replication protein A*) se lie à la cassure et produit un signal pour le recrutement d'ATR. Au-delà d'un certain seuil d'activité locale d'ATM et ATR, d'autres facteurs de la réponse aux dommages à l'ADN sont engagés et agissent à distance du site de la lésion de l'ADN : ATM phosphoryle et active la kinase CHK2, ATR la kinase CHK1. Elles diffusent dans le noyau et transmettent les signaux de réponse aux dommages à l'ADN en phosphorylant leurs cibles. Différentes voies de signalisation, souvent redondantes, sont sollicitées et aboutissent à la régulation de facteurs importants, comme p53 ou les phosphatases CDC25¹⁰, qui vont générer une réponse cellulaire effective. La signalisation dépendant d'ATM ou d'ATR induit des profils différentiels de modifications post-traductionnelles selon la nature du dommage et l'intensité du signal de stress, qui « façonneront » une réponse p53 appropriée et proportionnée. L'événement clef dans l'induction de la signalisation par p53, indépendamment du stimulus, est la libération de p53 de ses inhibiteurs (MDM2 et MDMX) (pour revues : d'Adda di Fagagna, 2008 ; Harris et Levine, 2005 ; Meek, 2009).

¹⁰ La fonction des CDK est régulée par une phosphorylation au niveau de sites spécifiques. CDC25 est une famille de phosphatases qui assurent la déphosphorylation des sites inhibiteurs des CDK (Morgan, 2007).

Contexte bibliographique

p53 peut aussi être activée par la voie ARF (*alternate reading frame protein*), indépendante des voies de dommages à l'ADN (Bouchard et *al.*, 2007) (**Figure 27**). ARF (p19^{ARF} chez l'homme et p14^{ARF} chez la souris, codée par le locus *CDKN2A*, qui code aussi INK4A) est un inhibiteur de MDM2, présent normalement en faible quantité dans la cellule. L'activation de cette voie par les oncogènes est le mécanisme par lequel p53 répond à une prolifération excessivement anormale qui crée un stress cellulaire oncogénique (pour revue, Meek, 2009). Cette voie d'activation de p53 fournirait un premier niveau de défense contre la tumorigenèse, avant même que la cellule ne subisse des altérations de son ADN (Van Dyke, 2007). Chez la souris, la fonction de « gendarme des oncogènes » (activée par ARF) serait le principal mécanisme de protection contre le cancer, devant la fonction de « gardien du génome » (pour revue, Efeyan et Serrano, 2007). En effet, les dommages à l'ADN peuvent induire l'apoptose p53-dépendante, mais également d'autres formes de mort, en l'absence de p53, comme la catastrophe mitotique, qui conduiront les cellules potentiellement cancéreuses à leur perte. Sous l'effet d'une stimulation oncogénique, les cellules possédant des fonctions ARF et p53 intactes subiront l'apoptose ou la sénescence. En revanche, les cellules dépourvues d'ARF ou de p53 continueront à proliférer et se transformeront, donnant naissance à un cancer. Les deux types de signalisation sont néanmoins interconnectés (Pauklin et *al.*, 2005) : le signal oncogénique, par exemple *c-myc*, peut créer des lésions de l'ADN, notamment par la production d'espèces réactives de l'oxygène ou par une activation excessive des origines de réplication, et activer également ATM (Efeyan et Serrano, 2007 ; Hong et *al.*, 2006 ; Pusapati et *al.*, 2006).

D'autres signaux de stress (hypoxie/anoxie, dysfonctionnement de la machinerie mitotique, inflammation, érosion des télomères...) activent également p53, et induisent des profils spécifiques de modifications de la protéine p53, comme lors de la stimulation des kinases ATM ou ATR (**Figure 27**). Les modifications post-traductionnelles affectent la protéine p53 de deux façons : elles augmentent sa demi-vie, ce qui accroît sa concentration dans la cellule, et stimulent sa capacité de liaison à ses séquences cibles d'ADN et ses fonctions régulatrices de la transcription. Ces deux types de changement définissent l'activation de p53 (pour revues : Harris et Levine, 2005 ; Levine et Oren, 2009). Différentes fonctions effectrices antiprolifératives de p53 ont été caractérisées. Chacune contribuerait, dans des circonstances particulières, à ses propriétés de suppression de tumeur (pour revue, Zilfou et Lowe, 2009).

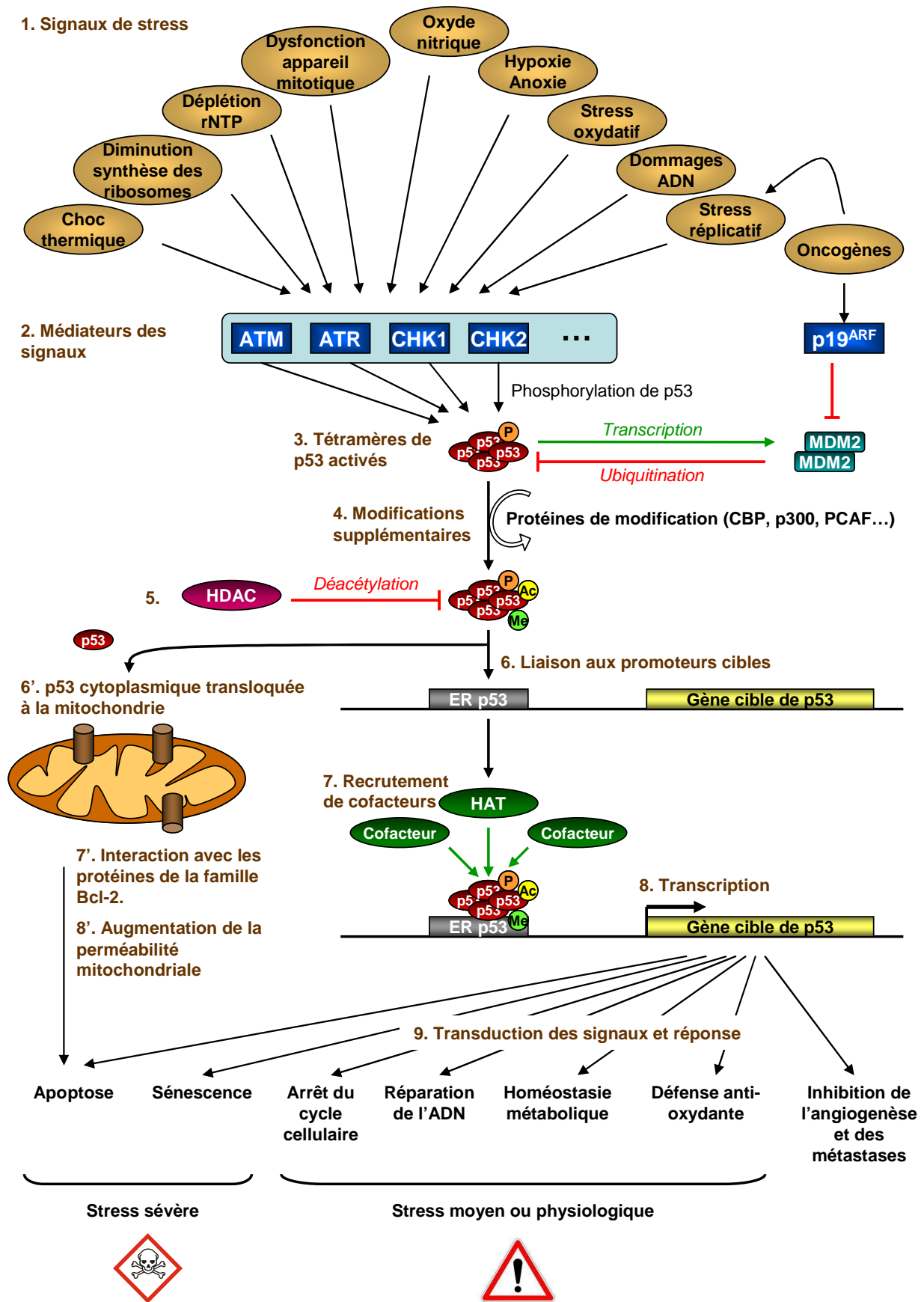


Figure 27. Les mécanismes d'activation de p53 et les réponses générées.

Les différentes étapes de la mobilisation de p53, du stimulus à la réponse effectrice, sont numérotées de 1 à 9. P : phosphorylation, Ac : acétylation, Me : méthylation, ER p53 : élément de réponse à p53 (au niveau du promoteur). Inspiré de Baptiste et Prives, 2004 ; Harris et Levine, 2005 ; Levine et Oren, 2009 ; Riley et al., 2008 ; Vogelstein et al., 2000 ; Vousden et Prives, 2009.

Contexte bibliographique

3.4.2. L'arrêt du cycle cellulaire

Certains signaux de stress peuvent induire un arrêt de la croissance cellulaire au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire, de sorte à éviter la propagation d'altérations de l'ADN. p53 activée peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire :

- en phase G1, qui peut être dû à la transactivation de *p21* (inhibiteur de CDK) ou à la répression transcriptionnelle de *c-myc* (Brown et al., 2007) ;
- en phase G2 par un mécanisme plus complexe, en ciblant des facteurs qui sont impliqués soit dans la régulation du cycle cellulaire (cycline B, CDK1, CDC25C), soit dans la mise en place de la machinerie mitotique (topoisomérase II ; B99/Gtse-1, protéine associée à la tubuline cytoplasmique et aux microtubules ; MAP4, protéine qui favorise l'assemblage des microtubules) (Brown et al., 2007). En effet, une partie des cibles transcriptionnelles de p53 permet d'inactiver CDK1 (CDC2), une kinase du cycle cellulaire dont l'activité est importante pour l'entrée en phase S : le complexe cycline B1-CDK1 (« facteur de promotion de la mitose ») régule en partie la transition G1-S. p53 a d'autres cibles qui, sans affecter CDK1, contribuent également à l'arrêt du cycle en phase G2 (Stark et Taylor, 2006 ; Taylor et Stark, 2001).

La régulation de la transition G2-M apparaît complexe avec de multiples contrôles potentiels redondants, impliquant des mécanismes p53-dépendants, mais aussi p53-indépendants (non décrits ici) (Stark et Taylor, 2006 ; Taylor et Stark, 2001). L'arrêt en phase G2 peut intervenir indépendamment de p53, mais son maintien nécessite l'intervention de p53 (St Clair et Manfredi, 2006). La multiplicité des phénomènes de surveillance au point de contrôle de la phase G2 assure la fidélité de la mitose (Zhan et al., 1999).

3.4.3. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est une forme permanente d'arrêt du cycle cellulaire, identifiée à partir de l'observation que les cellules normales ont une capacité limitée de prolifération en culture (Hayflick, 1965). Plusieurs stimuli peuvent induire la sénescence cellulaire. Parmi eux, certains mettent en jeu la voie de signalisation p53 (pour revue : d'Adda di Fagagna, 2008 ; Campisi et d'Adda di Fagagna, 2007). On peut distinguer :

- la sénescence cellulaire répliquative induite par l'usure des télomères à mesure des divisions cellulaires successives (Harley et al., 1990). Le raccourcissement des télomères provoque la perte progressive des inhibiteurs d'ATM et ATR fixés aux télomères. Les extrémités chromosomiques sont désormais reconnues comme de véritables cassures dans l'ADN et

activent une réponse aux dommages à l'ADN (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003 ; Gire *et al.*, 2004 ; Herbig *et al.*, 2004 ; Takai *et al.*, 2003) ;

- la sénescence induite par les dommages à l'ADN. La voie p53 est activement impliquée et fréquemment associée à l'expression de p21 et à l'activation de p16 (Beauséjour *et al.*, 2003 ; DiLeonardo *et al.*, 1994 ; Jacobs et de Lange, 2004 ; Stein *et al.*, 1999) ;
- la sénescence induite par les oncogènes (pour revue, Chandeck et Mooi, 2010). Elle s'oppose à la stimulation mitogénique excessive d'une cellule qui exprime fortement un oncogène agressif, par exemple *c-myc* (Grandori *et al.*, 2003). L'arrêt de la prolifération et l'induction de la sénescence correspondent à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, essentiellement par la voie dépendant d'ATR et de RPA. La sénescence est provoquée par les dommages à l'ADN dus à la réplication excessive de l'ADN. La sénescence p53-dépendante permet de retarder le déclenchement de lymphomes induits par *c-myc* (Post *et al.*, 2010). La tumorigenèse nécessiterait donc des mutations supplémentaires, notamment dans les voies p53 ou p16, pour surpasser l'induction de la sénescence (Braig *et al.*, 2005).

p53 contribue également à l'établissement du phénotype sécrétoire associé à la sénescence. Certaines enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, diverses chimiokines et cytokines impliquées dans la modulation de la réponse immune sont des cibles transcriptionnelles de p53 (Gorgoulis *et al.*, 2003 ; Xue *et al.*, 2007). Cette fonction de p53 représente un autre aspect de son rôle suppresseur de tumeur. L'activation de p53 permet en effet l'infiltration de composants de l'immunité innée dans la tumeur (Xue *et al.*, 2007).

3.4.4. L'apoptose

La fonction de p53 la plus étudiée actuellement est son implication dans l'induction et le contrôle de l'apoptose. Deux études sur des thymocytes de souris KO pour p53 ont mis en évidence le rôle de p53 dans le déclenchement d'un programme apoptotique : p53 est nécessaire pour induire l'apoptose après irradiation des cellules (Clarke *et al.*, 1993 ; Lowe *et al.*, 1993). De plus, des souris transgéniques *p53*-déficientes présentent un défaut d'apoptose, dû à la perte de fonction p53, corrélé à la progression tumorale (Parant et Lozano, 2003 ; Symonds *et al.*, 1994). L'apoptose contribue donc au rôle suppresseur de tumeur de p53 (Pusapati *et al.*, 2006 ; Sluss *et al.*, 2010). D'une part, l'activité pro-apoptotique de p53 est associée à ses fonctions de transactivation (activités « nucléaires » de p53). p53 peut activer la transcription de gènes qui favorisent l'apoptose (pour revues : Amaral *et al.*, 2010 ; Fridman et Lowe, 2003 ; Zilfou et Lowe, 2009). Les fonctions de transrépression de p53 favorisent également l'induction de l'apoptose : elle inhibe l'expression de

Contexte bibliographique

gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, comme le gène de la survivine (Ambrosini et *al.*, 1997).

D'autre part, p53 peut induire l'apoptose par des mécanismes indépendants de la transcription (activités « cytosoliques » de p53). En effet, des protéines p53 mutantes dépourvues de fonction de transactivation sont malgré tout capables de déclencher l'apoptose (Haupt et *al.*, 1995 ; Kakudo et *al.*, 2005). L'apoptose p53-dépendante peut avoir lieu sans synthèse d'ARN ni de protéines, et même en l'absence de noyau (Caelles et *al.*, 1994 ; Chipuk et *al.*, 2003). Cela suggère que p53 ne jouerait pas qu'un rôle d'activateur de gènes médiateurs de l'apoptose (Caelles et *al.*, 1994 ; et pour revues : Green et Kroemer, 2009 ; Speidel, 2010 ; Vaseva et Moll, 2009 ; Zilfou et Lowe, 2009). Cette fonction de p53 repose sur sa capacité d'interagir avec plusieurs membres de la famille Bcl-2 (**Figure 28**). En réponse aux signaux de stress, p53 est aussi transloquée dans la mitochondrie (Marchenko et *al.*, 2000). Elle induit la libération et l'activation de facteurs pro-apoptotiques et potentialise le déclenchement de l'apoptose (Jiang et *al.*, 2006). p53 interagit aussi avec les facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL), mais des divergences apparaissent dans l'interprétation de la fonction d'une telle interaction (Chipuk et *al.*, 2005 ; Mihara et *al.*, 2003 ; Vaseva et Moll, 2009 ; Vousden, 2005). Les effets biologiques de p53 résultent de la combinaison de ses activités de protéine nucléaire et cytoplasmique. L'apoptose induite par p53 extranucléaire pourrait constituer un mécanisme de sécurité contre l'inhibition dominante de l'activité de transactivation (due par exemple à la séquestration de facteurs limitants par des formes mutantes de p53, à l'occupation des promoteurs par une isoforme dépourvue d'activité transactivatrice ou par la « contamination » des tétramères par des monomères mutés) (Heyne et *al.*, 2008).

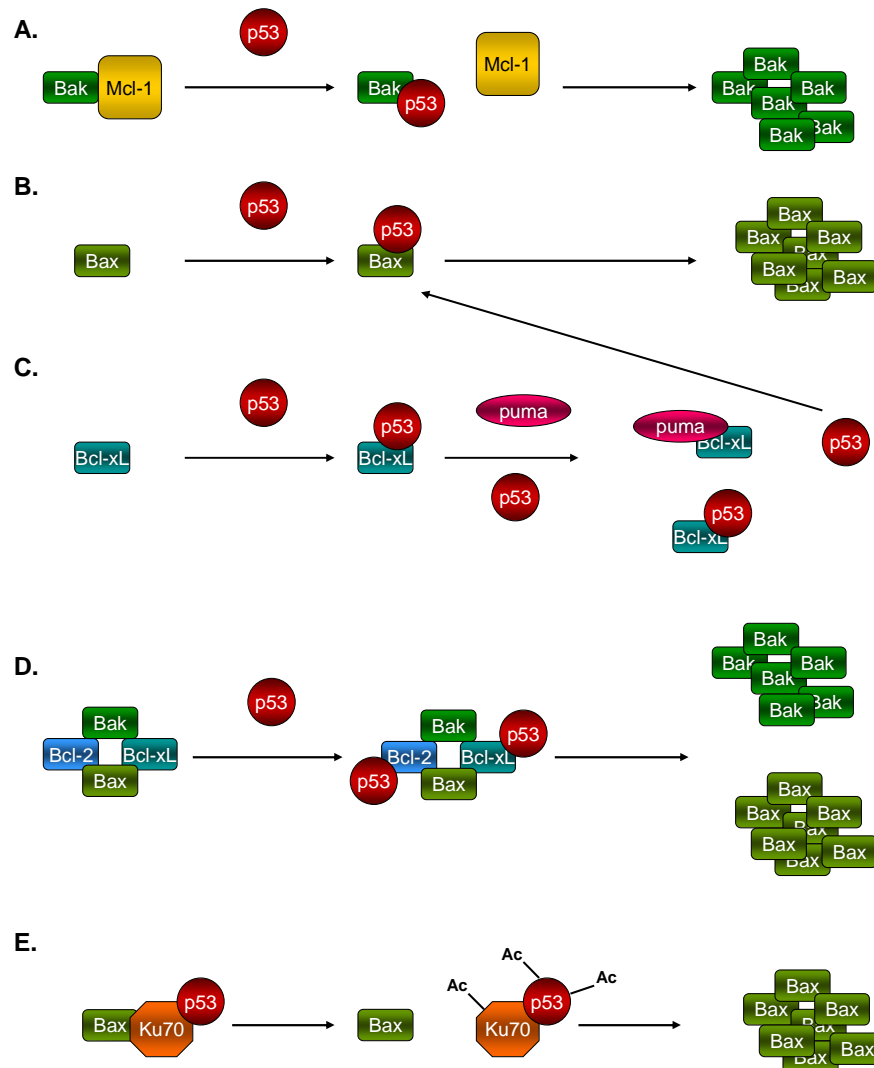


Figure 28. Interactions de p53 avec les protéines de la famille Bcl-2 et leur effet dans la mise en place du programme apoptotique.

Différents modèles ont été proposés pour expliquer comment ces interactions favorisent l'induction de l'apoptose. A. p53 peut se lier à Bak au niveau de la mitochondrie et désorganiser le complexe entre Bak et son inhibiteur Mcl-1. B. p53 cytosolique peut favoriser l'activation directe de Bax en catalysant sa translocation à la mitochondrie et son oligomérisation. C. p53 qui s'accumule dans le cytosol est d'abord lié à Bcl-xL ce qui l'empêche d'activer Bax. Puma (une cible transcriptionnelle de p53), qui se lie à Bcl-xL, peut libérer p53 de son association avec Bcl-xL. Alternativement, de fortes concentrations de p53 qui dépassent la capacité de saturation de Bcl-xL peuvent surpasser la fonction inhibitrice de Bcl-xL, fournissant des quantités suffisantes de p53 active pour induire l'apoptose. D. Un autre modèle suggère plutôt que la liaison de p53 à Bcl-xL et Bcl-2 s'oppose à leur effet inhibiteur consistant à maintenir inactives Bax et Bak. Les complexes p53-Bcl-xL et p53-Bcl-2 favorisent l'oligomérisation et l'activation de Bax et Bak. E. L'acétylation (Ac) de p53 liée à la protéine de réparation de l'ADN Ku70 interrompt l'interaction cytoprotectrice entre Ku70 et Bax et permet l'activation de Bax et le déclenchement de l'apoptose. D'après Speidel, 2010.

3.4.5. Comment la réponse p53 est-elle orientée ? Décision du destin de la cellule...

La variété des fonctions effectrices de p53 indique que l'action de p53 est dépendante du contexte. Différents paramètres définissent cette dépendance au contexte et déterminent l'issue de l'activation de la voie p53 : le type cellulaire ou le tissu d'origine, le fonds génétique de la cellule, le microenvironnement de la cellule et la nature du stress (pour revues : Fridman et Lowe, 2003 ; Zilfou et Lowe, 2009). Le mécanisme exact qui gouverne cette dépendance au contexte est encore

Contexte bibliographique

obscur. Deux modèles (non exclusifs) ont été proposés (pour revues : Meek, 2004 ; Zilfou et Lowe, 2009) :

- les changements quantitatifs (en relation avec l'affinité différente des promoteurs des gènes cibles) et qualitatifs (modifications post-traductionnelles) de p53 orienteraient la réponse biologique ;
- la cellule interpréterait différemment la signalisation par p53 en fonction des autres gènes qu'elle exprime : la réponse p53 dépendrait de la superposition entre la voie de signalisation par p53 et les autres voies de signalisation de la cellule.

3.5. p53 et le lymphocyte B

Le locus *IgH*, physiologiquement soumis à des remaniements et à des mutations durant la différenciation lymphocytaire B (*cf.* chapitre 1), est une zone critique d'instabilité génomique et de translocations chromosomiques (*cf.* chapitre 2). La signalisation dépendante d'ATM et de p53 intervient au cours de la formation de cassures dans l'ADN pour prévenir une évolution délétère et empêcher la cellule de dégénérer en un cancer.

Les cassures générées lors de la recombinaison V(D)J et non résolues émettent un signal qui cause l'accumulation de p53 et provoque l'élimination de la cellule par apoptose. Ce phénomène, d'abord mis en évidence dans des souris *scid*, montre que l'immunodéficience de ces souris n'est pas due exclusivement à l'incapacité d'induire des signaux de sélection positive *via* le récepteur antigénique de surface : elle s'explique aussi par la survie limitée des lymphocytes de ces souris à cause de l'apoptose p53-dépendante stimulée par les cassures issues de la recombinaison V(D)J. Une déficience en p53 dans les souris *scid* augmente la survie des précurseurs B et synergise avec la mutation *scid* pour favoriser le développement rapide de cancers (Guidos et *al.*, 1996). Le groupe de D. A. Ramsden a montré qu'ATM est recrutée au niveau des intermédiaires de recombinaison V(D)J, pour les détecter, les évaluer et les surveiller. ATM distingue ensuite les intermédiaires normaux des véritables cassures pernicieuses par l'induction de leur réparation par la voie de jonction des extrémités, auquel cas elle atténue son activité kinase et n'active pas ses cibles effectrices (p53, NBS1, H2AX). Au contraire, si un complexe de jonction des extrémités complet ne s'assemble pas, ATM maintient son activité. ATM ne serait donc pas nécessaire pour les recombinaisons V(D)J normales mais serait indispensable pour permettre une suppression efficace des produits délétères de recombinaison V(D)J aberrante (Perkins et *al.*, 2002). La déficience en p53 a un effet synergique avec la déficience en facteurs de jonction des extrémités, et augmente la

fréquence de cancers liés à une recombinaison V(D)J aberrante (Difilippantonio et al., 2000 ; Frank et al., 2000 ; Vanasse et al., 1999).

Plus récemment, une étude a confirmé le rôle de la signalisation ATM-p53 dans le maintien de la stabilité du génome dans les lymphocytes en développement (Dujka et al., 2010). L'activation d'un programme de surveillance impliquant ATM et p53 est essentielle pour réguler le cycle cellulaire de sorte que les cassures soient confinées en phases G0/G1 et afin d'empêcher la prolifération de cellules avec des cassures double brin persistantes. Dans cet objectif, les extrémités signal produites lors de la recombinaison V(D)J activeraient cette surveillance et inhiberaient une progression prématurée en phase S, jusqu'à ce qu'un pré-BCR ou un BCR fonctionnels soient exprimés et que la cellule reçoive des signaux de survie et de prolifération. En l'absence de tels signaux, ATM et p53 induisent l'apoptose (Dujka et al., 2010). L'inactivation simultanée de p53 et de Ku80 favorise le développement de lymphomes pro-B agressifs. Les cellules pro-B déficientes en Ku80, avec des anomalies chromosomiques générées à la suite de cassures RAG-dépendantes non réparées, sont normalement éliminées par une voie impliquant p53 (Jankovic et al., 2007). De même, la déficience conjointe d'Artemis et de p53 promeut l'émergence de lymphomes pro-B avec des translocations entre des oncogènes et le locus *IgH*, qui résultent de recombinaisons V(D)J aberrantes. Artemis et p53 coopèrent pour enrayer la transformation cellulaire (Jankovic et al., 2007). Le point de contrôle ATM empêche la persistance des cassures V(D)J, bloque leur transmission aux cellules filles et prévient ainsi les translocations oncogènes-IgH. Les cellules avec des chromosomes endommagés par les RAG ne peuvent pas se propager (Callén et al., 2007). p53 minimise donc le potentiel oncogénique de recombinaisons V(D)J anormales.

Les points de contrôle p53-dépendants interviennent aussi pour protéger l'organisme de la propagation de cellules dont l'intégrité est compromise par AID. Par exemple, les cellules B sont normalement protégées vis-à-vis des translocations *c-myc-IgH* AID-dépendantes par ATM, p19 (ARF) et p53 (Jankovic et al., 2010). Les cellules B p53^{-/-} ou p53^{+/-} présentent une augmentation de la fréquence des translocations *c-myc-IgH* induites par AID. La déficience en p19 augmente aussi la fréquence des translocations. Les axes de signalisation ARF-p53 et ATM-p53 assurent des rôles complémentaires dans l'élimination des cellules cancéreuses naissantes aux différentes étapes de la réaction de translocation. La voie p53 peut être activée soit directement par les cassures double brin générées par AID (axe ATM-p53), soit indirectement par l'expression dérégulée de l'oncogène transloqué, dans ce cas *c-myc* (axe ARF-p53). Il n'est donc pas surprenant que les gènes impliqués dans ces voies de signalisation soient fréquemment altérés dans les lymphomes caractérisés par des translocations chromosomiques. Les mutations ou la diminution de l'expression de p53 contribuent précocement à la pathogenèse de lymphomes en facilitant les translocations induites par AID

Contexte bibliographique

(Jankovic et *al.*, 2010 ; Ramiro et *al.*, 2006). En effet, la dérégulation d'AID augmente les mutations somatiques et l'instabilité génomique, mais n'est pas suffisante pour provoquer la transformation maligne. La perte de p53 semble nécessaire pour la malignité, mais n'augmente pas significativement le taux de cassures de l'ADN ou de translocations. Par ailleurs, p53 n'empêche par la translocation *per se*. Cela indique que p53 agit en aval des translocations pour empêcher la cancérisation : son rôle consiste à éliminer les cellules avec des translocations AID-dépendantes qui activent des oncogènes (Robbiani et *al.*, 2009).

Problématique & objectifs

Les lymphomes (groupe hétérogène de cancers comprenant les lymphomes non hodgkiniens, les lymphomes de Hodgkin, les myélomes et les leucémies) représentent globalement entre 3 et 4% des cancers de la planète. En 2008, 7,5% des nouveaux cas de cancers chez l'homme étaient des hémopathies lymphoïdes, 6,4% chez la femme (Roman et Smith, 2011). La compréhension des mécanismes d'instabilité génétique à l'origine du cancer et la caractérisation des voies de signalisation moléculaire et cellulaire qui facilitent sa progression dans les tissus constituent l'un des enjeux de la recherche fondamentale. D'une part, une meilleure connaissance dans ces domaines permet d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques pertinents pour caractériser la maladie. D'autre part, elle permet de définir les différents types et sous-types de cancers et de mieux comprendre les réponses variables des patients face aux thérapies standards. Elle permet enfin, à terme, de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées, spécifiques, innovantes et plus efficaces. Le développement de modèles murins constitue une étape importante dans la compréhension des mécanismes moléculaires pathologiques qui sous-tendent l'émergence, la croissance et la dissémination des tumeurs.

Comme nous l'avons vu, les événements de recombinaisons géniques et de mutations qui ponctuent la maturation des cellules B compromettent dangereusement l'intégrité du génome et font du locus *IgH* un site intrinsèquement instable. Par conséquent, à la suite de translocations, des oncogènes peuvent être insérés dans le locus *IgH*. Ils passent alors sous le contrôle d'activateurs transcriptionnels du locus qui vont déréguler leur expression. E μ fut le premier élément *cis*-régulateur identifié dans le locus *IgH*. Très logiquement, il fut rapidement considéré comme l'élément clef responsable de la dérégulation des oncogènes transloqués. Les premiers modèles murins de lymphomes ont associé des oncogènes (*c-myc*, *bcl-2*) à E μ pour tenter de reproduire les pathologies humaines (Adams et *al.*, 1985 ; McDonnell et *al.*, 1989). Ces modèles développaient effectivement des lymphomes, mais la population tumorale était à un stade de développement relativement précoce et de fait peu pertinente comparée au phénotype mature de la plupart des lymphomes humains.

La découverte des activateurs de la 3'RR a ouvert de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la lymphopathogenèse, d'autant plus que leur cinétique d'activation (stades tardifs de la lymphopoïèse B) semblait mieux concorder avec le phénotype mature des lymphomes. En utilisant *c-myc*, dont la translocation dans le locus *IgH* est typiquement observée dans le lymphome de Burkitt chez l'homme et le plasmocytome chez la souris (Janz, 2006), différentes approches expérimentales impliquant la 3'RR ont permis de mimer ces hémopathies, suggérant un rôle prépondérant de la 3'RR dans la dérégulation de *c-myc* (Bützler et *al.*,

Problématique & objectifs

1997 ; Palomo et *al.*, 1999 ; Park et *al.*, 2005a, 2005b ; Wang et Boxer, 2005). Un modèle a également été réalisé au laboratoire, par une approche transgénique de type « mini-locus ». Le gène *c-myc*, avec ses promoteurs endogènes, a été placé sous le contrôle transcriptionnel d'une 3'RR miniature mais conservant sa configuration palindromique endogène. Ce modèle *c-myc*-3'RR a permis de générer des lymphomes de Burkitt, montrant que la 3'RR, indépendamment de tout autre élément *cis*-régulateur du locus, était suffisante pour déréguler *c-myc* et favoriser la lymphomagenèse (Truffinet et *al.*, 2007).

Une partie de notre travail de thèse a consisté à poursuivre les études sur le rôle de la 3'RR dans la lymphomagenèse. D'une part, en appliquant la même stratégie expérimentale que Truffinet et *al.*, nous avons construit des vecteurs de transgénèse permettant la surexpression B-spécifique de différents oncogènes. Le but de ces travaux consistait à tenter de mimer quelques autres désordres lymphoprolifératifs : le lymphome du manteau (Pérez-Galán et *al.*, 2011), en surexprimant la cycline D1, le myélome (Raab et *al.*, 2009) avec la cycline D3, le lymphome folliculaire (Vitolo et *al.*, 2008) avec *Bcl-2* et son homologue *Bcl-xL*. D'autre part, nous sommes repartis du modèle *c-myc*-3'RR et avons associé la dérégulation de *c-myc* à des mutations coopératives : l'expression d'une CDK4 constitutivement active (CDK4^{R24C}) ou la déficience en p53. Notre objectif était de faire émerger d'autres hémopathies liées à la présence de *c-myc* mais que le seul modèle *c-myc*-3'RR ne suffisait pas à générer.

Résultats

Article 1. A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies.

Rémi Fiancette, Rada Amin, Véronique Truffinet, Christelle Vincent-Fabert, Nadine Cogné, Michel Cogné & Yves Denizot.

Leukemia Research, 2010, volume 34, numéro 8, pages 1043-1051.

Article 2. Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné & Yves Denizot.

Leukemia Research, 2009, volume 33, numéro 11, pages e203-e206.

Manuscrit 3. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint in conjunction with a c-myc alteration induces mantle cell lymphomas in transgenic mice.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Pauline Rouaud, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Virginie Magnone, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

Soumis à *Leukemia*.

Manuscrit 4. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene.

Rémi Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Michel Cogné & Yves Denizot.

En préparation.

A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies.

Rémi Fiancette, Rada Amin, Véronique Truffinet, Christelle Vincent-Fabert, Nadine Cogné, Michel Cogné & Yves Denizot.

Leukemia Research, 2010, volume 34, numéro 8, pages 1043-1051.

Compte-tenu de l'efficacité de la stratégie expérimentale de type « mini-locus » dans la modélisation du lymphome de Burkitt (Truffinet et *al.*, 2007), nous avons tenté de mettre au point un modèle murin de lymphome du manteau selon la même approche. La caractéristique génétique de la plupart des cas de lymphome du manteau humain est la translocation du gène codant la cycline D1 (*CCND1*) dans le locus *IgH*, à la suite d'erreurs lors des recombinaisons V(D)J (Campo et *al.*, 1999). La cycline D1 est un régulateur important du cycle cellulaire. C'est le partenaire des kinases de la phase G1 (CDK4 et CDK6) qui jouent un rôle déterminant dans le franchissement du point de restriction, l'entrée en cycle et donc l'induction de la prolifération (Sherr, 1995). Or, la prolifération est une étape critique de l'oncogenèse. Nous avons souhaité vérifier si la 3'RR, dans sa configuration palindromique endogène et indépendamment de tout autre élément *cis*-régulateur, était suffisante pour déréguler la cycline D1. Nous avons construit un vecteur contenant l'ADNc de *CCND1* humain, le promoteur pV_H et une 3'RR miniature, afin de déréguler spécifiquement l'expression de la cycline D1 dans les lymphocytes B matures, conformément au phénotype du lymphome du manteau. L'ensemble était borné par un isolateur (élément hs4 du locus de la β -globine du poulet) de part et d'autre, pour bonifier l'expression du transgène et minimiser les effets positionnels lors de l'intégration dans le génome.

Dans les souris *CCND1*-3'RR, la cycline D1 transgénique (humaine) est bien exprimée dans les cellules B de la moelle osseuse et de la rate, mais pas dans les organes non lymphoïdes. Elle n'altère pas la maturation des cellules B, n'affecte pas leur nombre, mais semble toutefois légèrement accroître le taux de sécrétion de la plupart des isotopes d'immunoglobuline. La surexpression de la cycline D1 augmente le potentiel prolifératif des splénocytes : après 18 heures de stimulation *in vitro*, les splénocytes entrent davantage en cycle. Néanmoins, au bout de 72 heures de stimulation, la situation s'est inversée et leur survie est significativement plus faible que celle des cellules sauvages. Sur une période de près de deux ans, les souris transgéniques ont le même taux de mortalité que les souris sauvages et ne développent pas de tumeurs spontanées.

Des résultats comparables ont été obtenus avec les souris E μ -cycline D1 (Bodrug et *al.*, 1994 ; Lovc et *al.*, 1994). La surexpression de la cycline D1 dans les cellules B n'est donc pas

Résultats

oncogénique *per se in vivo*. La cycline D1 n'est pas un oncogène fort, à la différence de *c-myc* ou de *ras*, et ne suffit pas à elle seule à promouvoir la transformation cellulaire et la tumorigenèse. Un modèle surexprimant une cycline D1 mutée constitutivement nucléaire, qui ne peut plus être ciblée pour être exportée du noyau, dissociée de sa kinase et dégradée, a permis de faire émerger des lymphomes B matures proches du lymphome du manteau (Gladden et al., 2006). Physiologiquement, la localisation cytoplasmique de la cycline D1 n'a pas de finalité fonctionnelle : c'est uniquement l'endroit où elle s'associe avec ses kinases partenaires (CDK4 et CDK6), avant que le complexe ne soit finalement transloqué dans le noyau où il va pleinement exercer son activité facilitatrice sur la prolifération (Sherr, 1995). Ce n'est pas exclusivement la cycline D1 en tant que telle qui est oncogénique : ce sont également son implication fonctionnelle dans un complexe avec CDK4/6, la translocation nucléaire de ce complexe et l'activité résultante de la kinase, qui sont probablement tout autant, voire plus, oncogéniques. La signalisation dépendante de CDK4/6, et de leurs inhibiteurs spécifiques (INK4), serait donc impliquée dans la lymphomagenèse. Nous avons étudié le rôle de l'axe CDK4/6-INK4 dans la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante en transférant le modèle *c-myc*-3'RR d'un fond C57BL/6 (Truffinet et al., 2007) à un fond BALB/c (**Article 2**) dans lequel le locus *INK4a/ARF* contient deux mutations faux-sens qui codent un variant p16 dépourvu d'activité inhibitrice sur les complexes cycline D-CDK4/6 (Zhang et al., 1998).

Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated *c-myc* transgene.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné & Yves Denizot.

Leukemia Research, 2009, volume 33, numéro 11, pages e203-e206.

La cycline D1 exerce l'essentiel de ses fonctions sur le cycle cellulaire en association avec CDK4 (ou CDK6) (Sherr, 1995). En agissant à un point critique du cycle cellulaire (point de restriction), elle joue un rôle déterminant dans le comportement prolifératif de la cellule. Néanmoins, des travaux précédents ont montré que la simple surexpression de la cycline D1 ne suffisait pas à accroître son activité ni celle de sa kinase associée, et à induire la transformation maligne (Bodrug et *al.*, 1994 ; Fiancette et *al.*, 2010 ; Lovec et *al.*, 1994). Deux modèles murins de lymphome du manteau ont malgré tout pu être obtenus : un modèle fondé sur la surexpression de la cycline D1 associée à une injection intrapéritonéale de pristane (huile minérale) chez des souris BALB/c E μ -*CCND1* âgées (Smith et *al.*, 2006), et un modèle associant la surexpression de *c-myc* et de l'IL-14, un puissant facteur de croissance des cellules B, associé à plusieurs types de tumeurs B (Ford et *al.*, 2007). Toutefois, ces modèles semblent peu pertinents ou peu fidèles à la lymphomagenèse spontanée naturelle en raison des conditions hautement spécifiques et/ou des stimuli inducteurs nécessaires pour établir un contexte pathogénique. Dans le premier cas, le lymphome ne se développe que chez des souris âgées (un an) et dans un fond génétique spécifique (BALB/c), bien que les stimuli inducteurs testés dans chaque condition soient rigoureusement identiques. Par ailleurs, une injection de pristane est nécessaire et le lymphome n'est donc pas occasionné seulement par des facteurs génétiques internes avec une éventuelle influence de l'environnement (Smith et *al.*, 2006). Dans le second cas, même si la surexpression de la cycline D1 est observée à la suite de dérégulations secondaires, l'implication de la signalisation par l'IL-14 n'a pour l'instant pas été documentée dans la lymphomagenèse du manteau (Ford et *al.*, 2007). Par conséquent, ces modèles ne reflètent pas, ou à une probabilité nettement plus faible que la fréquence du lymphome du manteau, des dysfonctionnements pouvant survenir spontanément et perturber la physiologie cellulaire.

Pour créer un modèle de lymphome du manteau plus réaliste, nous avons aussi opté pour une stratégie alternative : nous avons souhaité favoriser une activité plus durable des complexes cycline D1-CDK4/6 sur le cycle cellulaire, en induisant un contexte d'expression de ces complexes dépourvu de la répression des CDK par les inhibiteurs INK4, en particulier p16. Nous avons travaillé dans un fond génétique BALB/c. Le fond BALB/c se caractérise d'une part par la présence

Résultats

de deux mutations faux-sens dans le locus *INK4a/ARF*, qui codent un variant p16 inactif (Zhang et al., 1998), d'autre part par un polymorphisme au niveau du gène suppresseur de tumeur *Frap* (*FKBP12 rapamycin-associated protein, mTOR, RAFT*) qui définit un variant moins actif (Bliskovsky et al., 2003). Les « allèles de sensibilité » associés pour ces deux loci au fond BALB/c prédisposent les souris au développement de plasmocytomes après une réponse inflammatoire chronique provoquée par l'injection de pristane (Janz 2008 ; Potter et al., 1975). Néanmoins, les souris BALB/c sauvages ne présentent pas de sensibilité particulière au développement de lymphomes du manteau. Par ailleurs, un modèle de souris exprimant une CDK4 mutée insensible à l'inhibition par les INK4, qui représente, au moins partiellement, un équivalent fonctionnel du fond BALB/c du point de vue de l'axe INK4-CDK4, développent des tumeurs, mais très peu de lymphomes et aucun lymphome du manteau (Rane et al., 2002 ; Sotillo et al., 2001). Cela suggère que la simple absence de la fonction INK4 ne suffit pas à promouvoir la lymphomagenèse, et que des mutations secondaires coopératives sont nécessaires. L'absence de la répression par INK4 maintient l'activité de CDK4. Or, l'une des cibles de CDK4 est *c-myc*, et inversement, *CDK4* est une cible de *c-myc* (Hermeking et al., 2000 ; Menssen et Hermeking, 2002). Nous sommes donc partis du postulat que la surexpression de *c-myc* pouvait potentiellement collaborer avec l'activité de CDK4 dans la dérégulation de la cellule, sa transformation et l'émergence d'un lymphome. En particulier, la délétion de *p16* (codant l'un des inhibiteurs de la famille INK4), un niveau élevé de CDK4 ou la surexpression de *c-myc* sont observés dans certains variants blastoïdes du lymphome de manteau (Beà et al., 1999 ; Hernández et al., 1999 ; Parrens et al., 2006)

Un modèle murin de lymphome a été établi au laboratoire : le modèle *c-myc-3'RR*. Dans un fonds C57BL/6, la dérégulation de l'expression de *c-myc* par la 3'RR déclenche l'apparition de tumeurs de type lymphome de Burkitt (Truffinet et al., 2007). Nous avons croisé sur plusieurs générations les souris *c-myc-3'RR* C57BL6 avec des souris BALB/c sauvages, afin de transférer le transgène dans le fond BALB/c, et d'associer ainsi la surexpression de *c-myc* et l'absence d'inhibition de CDK4. Les souris *c-myc-3'RR* BALB/c ont une durée de vie semblable aux souris BALB/c sauvages et ne développent pas de lymphome. Pourtant, le transgène est bien fonctionnel : les souris transgéniques surexpriment significativement *c-myc* dans la rate, comparées aux souris contrôles sauvages. Toutefois, contrairement à ce qui est observé chez les souris *c-myc-3'RR* C57BL6, les cellules B des souris *c-myc-3'RR* BALB/c n'ont pas de capacités prolifératives augmentées par rapport aux cellules sauvages, après stimulation *in vitro*.

Le fond génétique BALB/c semble résistant à la lymphomagenèse dépendant du transgène *c-myc-3'RR*. Les capacités prolifératives induites par *c-myc* dans le fond C57BL6 ne se manifestent plus dans le fond BALB/c. De ce fait, le transgène *c-myc-3'RR* ne peut pas exercer un effet

synergique avec l'altération de p16 pour promouvoir le lymphome du manteau. L'hétérogénéité génétique a donc un impact sur la signalisation *c-myc*-dépendante et la réponse proliférative des cellules B. Leur comportement différentiel face à *c-myc* détermine des sensibilités variables pour l'émergence de lymphomes.

A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint in conjunction with a *c-myc* alteration induces mantle cell lymphomas in transgenic mice.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Pauline Rouaud, Christel Baudet, Véronique Truffinet, Virginie Magnone, Michel Cogné, Pierre Dubus & Yves Denizot.

Soumis à *Leukemia*.

Après ces tentatives infructueuses pour créer un modèle de lymphome du manteau, nous avons développé une troisième stratégie. Nous avons cherché à amener la cycline D1 à agir plus facilement et plus durablement sur le cycle cellulaire par l'intermédiaire d'une protéine CDK4 plus assujettie à une régulation négative par les inhibiteurs INK4 : la protéine CDK4^{R24C}. Cette kinase mutante a été découverte initialement dans un cas de mélanome humain. La substitution de l'arginine en position 24 en cystéine (R24C) abolit l'interaction entre les inhibiteurs INK4 et CDK4, rendant cette dernière non inhibable, constitutivement active et potentiellement oncogénique (Wölfel et al., 1995). Les souris CDK4^{R24C/R24C} développent très rarement des lymphomes (Rane et al., 2002 ; Sotillo et al., 2001). De façon semblable à notre démarche précédente, face à la nécessité de mutations secondaires et étant donné que *c-myc* et CDK4 sont des partenaires réciproques (Hermeking et al., 2000 ; Menssen et Hermeking, 2002), nous nous sommes demandé si *c-myc* pouvait coopérer à la lymphomagenèse dans les souris CDK4^{R24C}. Nous avons croisé les souris *c-myc*-3'RR (Truffinet et al., 2007) avec des souris CDK4^{R24C} fournies par le Pr. Pierre Dubus (Université de Bordeaux 2, EA 2406), afin de placer le transgène *c-myc* dans un fond génétique où CDK4 est constitutivement active. Dans ce cas, nous ne nous sommes pas uniquement fondés sur les caractéristiques d'un polymorphisme particulier propre à une lignée de souris. Nous nous sommes donc affranchis du réseau complexe des autres caractères polymorphes de cette même lignée qui peuvent tout autant influencer sur les voies de signalisation et les processus physiologiques, et affecter la sensibilité ou la prédisposition de l'animal à tel ou tel processus pathologique.

Les souris *c-myc*-3'RR/CDK4^{R24C} ont une durée de vie comparable aux souris *c-myc*-3'RR, mais à la différence de celles-ci, ne développent pas de lymphomes de type Burkitt et ne présentent pas d'hypertrophie des ganglions périphériques. En revanche, à l'âge de 4 mois, elles manifestent une hyperleucocytose et une splénomégalie. Les frottis sanguins révèlent la présence d'une population de cellules malignes, que nous avons caractérisée par cytométrie en flux. Il s'agit de cellules B (B220⁺ CD19⁺) clonales exprimant IgM, IgD, CD43 et CD5, mais pas CD23. Ce profil d'expression est typique du lymphome du manteau humain (Garcia-Conde et Cabanillas, 1996 ; Parrens et al., 2006). Cette population infiltre la moelle osseuse et la rate, et est également abondante dans la cavité péritonéale. Le taux de prolifération des tumeurs est relativement faible, comparé à celui des

Résultats

lymphomes de Burkitt *c-myc-3'RR*. L'analyse mécanistique du cycle cellulaire par *Western blot* a révélé que la prolifération des cellules tumorales impliquait principalement les complexes cyclines D-CDK4, mais pas CDK6. L'analyse du transcriptome a montré des modifications tendant à amoindrir le statut apoptotique des cellules, mais pas de signature hautement proliférative.

En combinant la surexpression B-spécifique de *c-myc* et l'expression d'une CDK4 constitutivement active, nous avons donc pu créer un « modèle murin de lymphome du manteau ». La dérégulation de l'axe CDK4-INK4 promeut la lymphomagenèse seulement dans un contexte de surexpression de *c-myc*. Cette étude souligne le rôle majeur des inhibiteurs du cycle cellulaire, en particulier les INK4 (inhibiteurs des CDK de la phase G1), pour juguler une prolifération excessive potentiellement délétère et prévenir l'oncogenèse, comme cela a été suggéré dans des travaux précédents montrant que le stress oncogénique pouvait stimuler l'expression de p15 (Malumbres et *al.*, 2000) ou de p16 (Serrano et *al.*, 1997).

A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven *c-myc* transgene.

Rémi Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Michel Cogné & Yves Denizot.

En préparation.

La dérégulation et la surexpression de *c-myc* sont associées à plusieurs types de désordres lymphoprolifératifs (Boxer et Dang, 2001 ; Smith et *al.*, 2010). Néanmoins, le modèle *c-myc*-3'RR n'induit essentiellement que des lymphomes de Burkitt (Truffinet et *al.*, 2007). Nous avons souhaité créer un modèle de souris transgéniques capables de reproduire les différents types de lymphomes susceptibles d'émerger lorsque *c-myc* est surexprimé. Dans le modèle *c-myc*-3'RR, ce sont toujours les mêmes points de contrôle qui sont compromis, et les cellules B sont toujours dérégulées au même stade de leur maturation (IgM⁺ IgD⁺ CD43⁻ CD5⁻ CD23⁻ CD138⁻), ce qui occasionne le même type de tumeurs. Nous avons induit artificiellement un deuxième « coup » (*hit*) dans la progression tumorale, une mutation coopérative, en plaçant le transgène *c-myc* dans un fond génétique déficient pour p53, et avons ainsi anéanti d'autres mécanismes de surveillance et de sécurité de la cellule. Nous avons croisé les souris *c-myc*-3'RR (Truffinet et *al.*, 2007) avec des souris p53^{-/-} (Lowe et *al.*, 1993) fournies par le laboratoire du Pr. Jean-Pierre de Villartay (U768 Hôpital Necker – Enfants malades, Paris).

La perturbation de la voie suppressive de tumeur impliquant p53 semble être une étape clef de l'oncogenèse. En effet, d'une part, le gène *p53* est muté ou délété dans près de 50% des tumeurs humaines (Goh et *al.*, 2011 ; Vousden et Lu, 2002). Dans les cas où le gène n'est pas muté lui-même, la signalisation p53-dépendante est corrompue, notamment dans les lymphomes induits par *c-myc* (Capoulade et *al.*, 1998 ; Eischen et *al.*, 1999 ; Lindström et *al.*, 2001 ; Wilda et *al.*, 2004). D'autre part, dans les cancers où elle est affectée, la restauration de la fonction p53 favorise la régression tumorale, voire la rémission (Bossi et Sacchi, 2007 ; Dickins et *al.*, 2005 ; Sarek et *al.*, 2007 ; Ventura et *al.*, 2007 ; Wang et El-Deiry, 2008 ; Wiman, 2007 ; Xue et *al.*, 2007). Enfin, l'amputation de la signalisation p53-dépendante accélère l'émergence et l'évolution des lymphomes *c-myc*-dépendants chez la souris (Griesmann et *al.*, 2009 ; Hsu et *al.*, 1995 ; Schmitt et *al.*, 1999). En diminuant ou en interrompant l'action de la protéine p53, nous avons créé un contexte permissif pour la progression tumorale.

Les souris *c-myc*-3'RR p53^{+/-} développent des tumeurs dès l'âge de trois mois, qui se manifestent par une hypertrophie de la rate et des ganglions lymphatiques, et souvent une atteinte intestinale. La mortalité est accrue et précoce par rapport aux souris *c-myc*-3'RR. Les tumeurs sont

Résultats

des néoplasies B monoclonales : les cellules malignes expriment B220 et CD19. Elles sont hautement prolifératives. Contrairement au modèle *c-myc*-3'RR CDK4^{R24C}, les tumeurs présentent une hétérogénéité phénotypique, et nous avons pu dégager quatre grandes tendances :

- des lymphomes de Burkitt classiques : IgM⁺ IgD⁺ CD43⁻ CD138⁻ CD5⁻ ;
- des lymphomes de Burkitt présentant des signes d'activation et de sévérité, visibles par l'expression de CD43 ;
- des lymphomes de type manteau : IgM⁺ IgD⁺ CD43⁺ CD138⁻ CD5⁺ ;
- des tumeurs affectant les plasmoblastes : les cellules tumorales co-expriment CD19 et CD138, et ont perdu l'expression d'IgM et IgD. Elles ne sont pas sécrétantes et de ce fait ne correspondent pas à des myélomes.

L'analyse protéique du cycle cellulaire a révélé l'importance fonctionnelle des complexes impliquant CDK6 dans la lymphomagenèse. Une analyse du transcriptome est en cours (plateforme de génomique fonctionnelle de Nice-Sophia-Antipolis) afin de déterminer s'il existe un profil différentiel d'expression des facteurs clefs de la signalisation cellulaire selon le phénotype, et donc une signature génétique spécifique à chaque type de lymphome.

La perte de la fonction p53 accélère la progression tumorale. En accroissant l'instabilité génomique, elle diversifierait le spectre des mutations secondaires acquises et permettrait ainsi d'altérer d'autres points de contrôle et d'autres mécanismes de surveillance homéostatique de la cellule par rapport aux cellules surexprimant uniquement *c-myc*. Cela a finalement pour effet de diversifier le phénotype tumoral et de faire émerger des hémopathies additionnelles. Nous avons donc obtenu un modèle plus fidèle et plus réaliste de lymphomagenèse *c-myc*-dépendante.

Discussion Perspectives

La seule surexpression de la cycline D1 sauvage ne suffit pas à promouvoir la lymphomagenèse

Nous avons souhaité élaborer un modèle murin de lymphome du manteau. Dans plus de 90% des cas, ce désordre lymphoprolifératif est associé à la translocation chromosomique t(11;14) qui déplace le gène *CCND1* dans le locus *IgH*. Il se retrouve alors à proximité des éléments *cis*-régulateurs du locus qui vont influencer et perturber son expression. Nous avons souhaité vérifier si la translocation du gène de la cycline D1 dans le locus *IgH* et sa surexpression étaient suffisantes pour induire le lymphome du manteau et en constituait l'événement initiateur.

La réponse est clairement non (**Article 1**). Si le transgène *CCND1-3'RR* s'exprime dans les cellules B, la seule surexpression de la cycline D1 n'est pas oncogénique par elle-même. L'origine de cet échec, comme pour les souris E μ -*CCND1* (Bodrug et al., 1994 ; Lovec et al., 1994), se rapporte aux mécanismes régulateurs contrôlant l'action de la cycline D1. Malgré la surexpression de la cycline D1, ces mécanismes persistent et maintiennent les cycles de dégradation reconstruction (*turnover*) de la protéine. Les complexes cycline D1-CDK4/6 sont inhibés par la phosphorylation de la cycline sur le résidu Thr286, par la GSK3 β . Elle induit l'exportation nucléaire, la polyubiquitination et la destruction cytoplasmique de la cycline par le protéasome. Les complexes cycline-CDK sont donc dissociés et ne possèdent plus leur activité kinase promotrice du franchissement du point de restriction et de l'entrée en phase S. Il s'agit d'une boucle de régulation physiologique nécessaire au déroulement normal du cycle cellulaire (Diehl et al., 1998 ; et pour revue, Alao, 2007) (**Figure 29**).

Nos travaux, ainsi que d'autres études précédentes (Bodrug et al., 1994 ; Lovec et al., 1994), montrent que la surexpression de la cycline D1 sauvage n'est pas oncogénique *per se in vivo* dans les cellules B. La région régulatrice transcriptionnelle associée (E μ ou la 3'RR) n'a pas d'impact sur le potentiel oncogénique de la cycline D1. La dérégulation de la cycline D1 ne génère donc pas un oncogène puissant et dangereux, ce qui suggère que sa surexpression, observée dans de nombreux cancers, serait simplement un phénomène associé sans en être le *primum movens*. Selon une autre hypothèse, la surexpression de la cycline D1 dans ces pathologies ne serait que le premier « coup oncogénique » d'un processus multi-étape. Ceci est notamment soutenu par l'accélération de la lymphomagenèse dans les souris exprimant simultanément les deux transgènes E μ -*CCND1* et E μ -*myc* (Bodrug et al., 1994 ; Lovec et al., 1994). En effet, il est admis depuis longtemps que l'oncogénèse, en particulier la lymphomagenèse, nécessite l'action concertée de deux oncogènes ou plus (Adams et Cory, 1992 ; Hunter, 1991 ; Land et al., 1983). Toutefois, de façon surprenante, nous

Discussion Perspectives

n'avons observé aucun effet synergique lorsque nous avons croisé nos souris *CCND1-3'RR* avec des souris *c-myc-3'RR*. Une première explication pourrait résider dans la différence des éléments régulateurs utilisés dans chaque approche, qui induisent des lymphomes à différents stades de maturation cellulaire. Les souris $E\mu$ -*c-myc* développent des lymphomes pré-B, tandis que les souris *c-myc-3'RR* développent des lymphomes B matures. Nous pouvons alors supposer que la coopération entre *c-myc* et la cycline D1 et l'effet synergique résultant seraient différents en fonction du stade de maturité de la cellule. Une hypothèse alternative considère la nature des lymphomes des deux modèles surexprimant *c-myc*. Etant donné que la surexpression spontanée de la cycline D1 endogène est fréquemment observée dans les lymphomes des souris $E\mu$ -*c-myc* (Adams et al., 1985), la surexpression induite de la cycline D1 constituerait, chez les animaux doubles transgéniques, un événement facilitateur et accélérateur de la lymphomagenèse. Au contraire, la cycline D1 ne montre pas d'altération particulière dans les lymphomes de Burkitt des souris *c-myc-3'RR* (Truffinet et al., 2007).

La cycline D1 constitutivement nucléaire est oncogénique

Au-delà de la simple surexpression de la cycline D1, ce sont sa localisation subcellulaire et sa stabilisation, qui dépendent de la fonctionnalité de son trafic nucléo-cytoplasmique et de sa protéolyse, qui ont un effet décisif sur la tumorigenèse. En effet, un modèle murin surexprimant une cycline D1 mutée au niveau de la Thr286 (substituée par de l'arginine) reproduit le lymphome du manteau (Gladden et al., 2006). Cette forme mutante de la cycline D1 est insensible à la phosphorylation par la GSK3 β et persiste dans le noyau tout au long du cycle cellulaire (Diehl et al., 1997, 1998). C'est donc la cycline D1 constitutivement nucléaire, qui ne répond plus à son inhibition physiologique en phase S, qui est véritablement oncogénique (pour revue : Kim et Diehl, 2009).

Les mécanismes par lesquels la cycline D1 promeut l'oncogenèse sont relativement méconnus. Actuellement, deux grandes voies, dépendantes de l'association de la cycline D1 avec ses CDK partenaires, ont été identifiées (pour revue, Kim et Diehl, 2009) :

- la cycline D1 accroît fortement l'activité catalytique des CDK4/6 et favorise ainsi la prolifération continue des cellules : par ce mécanisme, la cycline D1 contribuerait à la tumorigenèse de façon indirecte ;
- les complexes associant la cycline D1 constitutivement nucléaire et CDK4/6 peuvent provoquer une instabilité génomique, et déclencher de façon plus directe le processus cancéreux. Ils stabilisent CDT1 (facteur du complexe de pré-réplication), qui est normalement dégradé en phase S pour éviter la mise en place d'une nouvelle phase de réplication dans le même cycle. Par conséquent, CDT1 stabilisé initie la re-réplication de

l'ADN dans la même phase S et aboutit à une instabilité génomique caractérisée par l'aneuploïdie des cellules. Cet effet repose sur la répression transcriptionnelle, par le complexe cycline D1-CDK4, des composants de l'ubiquitine ligase responsable de la dégradation de CDT1 (Cul4A et Cul4B), par des mécanismes encore non élucidés (Aggarwal et al., 2007) (**Figure 29**).

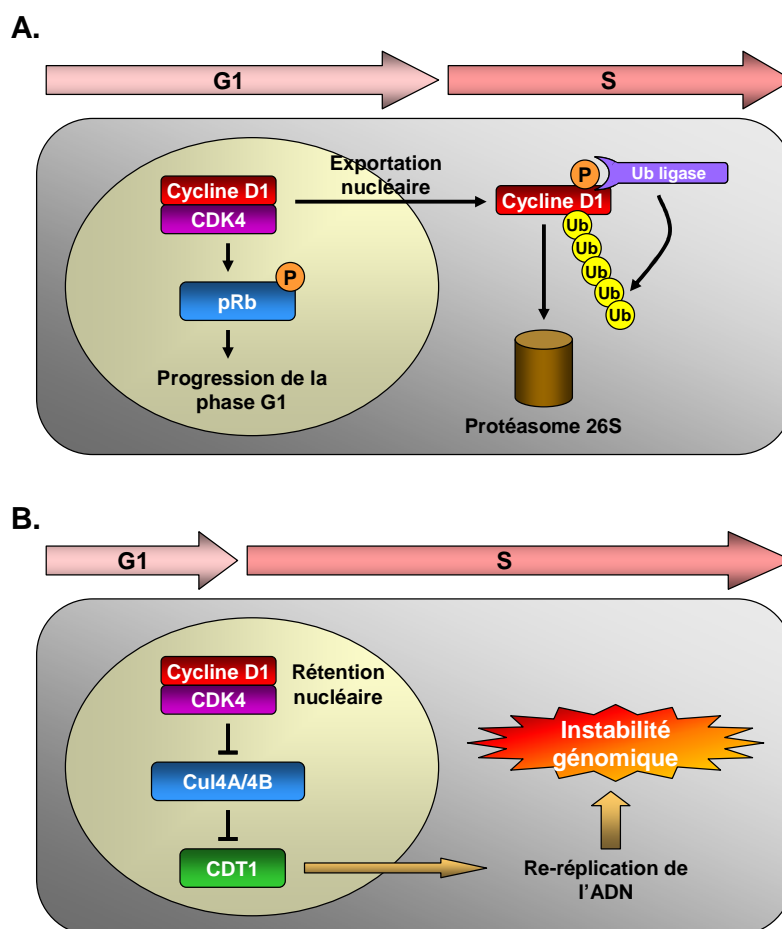


Figure 29. Action et régulation de la cycline D1 dans les cellules normales (A) et cancéreuses (B).

A. Dans les cellules normales, lors de l'entrée en phase S, la cycline D1 sort du noyau après phosphorylation de la Thr286 et exportation nucléaire par l'exportine CRM1. Dans le cytoplasme, la cycline D1 phosphorylée est ubiquitinée et dégradée par le protéasome. B. Dans les cellules cancéreuses, l'accumulation nucléaire de complexes cycline D1/CDK4 actifs en phase S stabilise CDT1 en inhibant Cul4A et Cul4B, ce qui favorise la re-réplication de l'ADN et crée l'instabilité génomique. D'après Kim et Diehl, 2009.

Outre son rôle canonique régulateur des CDK, la cycline D1 assure aussi des fonctions indépendantes du cycle cellulaire qui pourraient contribuer à son pouvoir oncogénique. Elle fonctionne comme un cofacteur transcriptionnel : elle interagit avec de multiples facteurs de transcription et module leur activité (pour revues : Coqueret, 2002 ; Fu et al., 2004 ; Kim et Diehl, 2009 ; Knudsen, 2006 ; Knudsen et al., 2006). En agissant sur des facteurs de transcription spécifiques, la cycline D1 influe sur les programmes de différenciation et inhibe des signaux inappropriés qui induiraient un arrêt du cycle cellulaire pendant la prolifération. La plus grande classe de facteurs de transcription régulés par la cycline D1 appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes. L'interaction de

Discussion Perspectives

la cycline D1 avec eux permettrait l'association du récepteur nucléaire avec ses coactivateurs même en l'absence du ligand. Par son rôle d'agoniste des récepteurs nucléaires, la cycline D1 favorise l'oncogenèse dans certains tissus et induit ainsi notamment le cancer du sein. La cycline D1 régule l'accessibilité des promoteurs et l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. Elle interagit avec des enzymes de modification et de remodelage de la chromatine et des facteurs de la machinerie transcriptionnelle. Elle modifierait les interactions entre les facteurs de transcription, le complexe d'initiation de la transcription et la chromatine pour moduler l'activité transcriptionnelle du promoteur (pour revues : Coqueret, 2002 ; Knudsen, 2006). Toutefois, la contribution relative de la fonction non canonique de la cycline D1 par rapport à sa fonction activatrice de CDK4/6 est encore à déterminer.

Une isoforme de la cycline D1, la cycline D1b (la cycline D1 canonique correspondant alors à l'isoforme D1a) a été identifiée. Elle est dépourvue de la séquence du cinquième exon contenant la Thr286 et le site de liaison à l'exportine, à la suite d'un épissage alternatif de l'ARN. Elle est donc constitutivement nucléaire (Betticher et *al.*, 1995 ; Lu et *al.*, 2003 ; Solomon et *al.*, 2003 ; pour revues : Gladden et Diehl, 2005 ; Knudsen, 2006 ; Knudsen et *al.*, 2006). La cycline D1b a des capacités transformantes nettement supérieures à l'isoforme D1a, qui rappellent le potentiel oncogénique de la cycline D1 T286A (Alt et *al.*, 2000) : elle induit la transformation cellulaire *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* (Lu et *al.*, 2003 ; Solomon et *al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que la cycline D1b était exprimée dans différents types de cancers ou de lignées tumorales (pour revue : Knudsen, 2006). La cycline D1b reste capable de s'associer à CDK4, mais les données semblent contradictoires quant à son rôle dans l'induction de l'activité catalytique de CDK4, dans la régulation de la phosphorylation de pRb et dans l'activation de la prolifération cellulaire. Outre l'épissage alternatif, d'autres phénomènes peuvent induire la production d'une cycline D1 constitutivement nucléaire (pour revue, Gladden et Diehl, 2005) :

- des mutations dans la portion codant la région C-terminale affectant le ciblage de la GSK3 β ou la liaison à l'exportine ;
- des mutations dans les voies de signalisation qui régulent la stabilité et la localisation de la cycline D1, par exemple l'axe ras-PI3K-Akt-GSK3 β ;
- des dysfonctionnements de l'ubiquitination de la cycline D1. Une déubiquitinase spécifique de la cycline D1 a été récemment identifiée : USP2. Sa présence a été corrélée à de hauts niveaux d'expression de la cycline D1 dans des lignées tumorales humaines. Son inactivation provoque une forte inhibition de la croissance des cellules cancéreuses surexprimant la cycline D1 (Shan et *al.*, 2009).

Le fond génétique BALB/c est résistant à la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante et ne prédispose pas au lymphome du manteau

Un rôle important de la cycline D1 est son implication fonctionnelle dans des complexes avec CDK4/6. Outre la dégradation de la cycline D1, un ciblage spécifique des CDK par les inhibiteurs INK4 permet aussi d'inactiver ces complexes (Sherr et Roberts, 1999). Notre tentative de modéliser le lymphome du manteau en agissant sur la cycline ayant été infructueuse, nous nous sommes focalisés sur le « bras armé » des complexes : la CDK. Pour affranchir les CDK4 et -6 de la répression par les INK4, nous avons utilisé le fond génétique BALB/c déficient en p16 (Zhang et *al.*, 1998). Nous y avons ajouté le transgène *c-myc-3'RR* pour induire une mutation coopérative.

Les souris *c-myc-3'RR* BALB/c ne développent aucun lymphome, malgré la surexpression de *c-myc* dans les cellules B et l'absence constitutive de p16 (**Article 2**). L'absence de p16, conjointement à la surexpression de *c-myc*, n'est donc pas oncogénique dans le fond BALB/c. Une explication pourrait être la compensation de l'absence de p16 par un autre membre de la famille INK4, par exemple p15. En effet, dans le fond BALB/c, la fonctionnalité de p15 n'est pas altérée. Par ailleurs, les altérations de la voie INK4-CDK4/6 dans les lymphomes et leucémies touchent principalement p15, suggérant que p15 aurait un rôle important dans la suppression des tumeurs lymphoïdes (Lee et Yang, 2001). Il est maintenant convenu que p15 est aussi efficace que p16 pour s'opposer à la croissance tumorale, et que les cellules cancéreuses auraient développé des stratégies leur permettant d'inactiver non seulement p16 mais aussi, conjointement, p15 (Lee et Yang, 2001). Malgré tout, cette hypothèse semble peu probable, et l'absence de tumeurs aurait une cause plus profonde liée à la permissivité du fond génétique. Même le potentiel oncogénique de *c-myc* dérégulé par la 3'RR qui s'exprime dans le fond C57BL6 (Truffinet et *al.*, 2007) ne se manifeste plus dans le fond BALB/c. Même si le fond BALB/c prédispose la souris à la survenue de plasmocytomes (Janz 2008 ; Potter et *al.*, 1975), il semble insensible à d'autres lymphomes. Cela peut sembler paradoxal, car les allèles polymorphes des souris BALB/c diminuent l'efficacité du gène suppresseur de tumeur *Frap* (Bliskovsky et *al.*, 2003). Toutefois, il peut exister potentiellement d'autres gènes polymorphes pas encore identifiés qui confèreraient aux souris BALB/c la résistance à certaines formes de lymphomes *c-myc*-dépendants. Cette étude souligne l'impact du fond génétique sur la susceptibilité des souris à déclencher un type de cancer. Il est en effet clairement admis que le développement d'un cancer, chez l'homme comme chez la souris, peut être influencé par le contexte génétique de l'individu et son polymorphisme génique (à titre d'exemples, parmi les articles les plus récents : Akkiz et *al.*, 2010 ; Jorgenson et *al.*, 2010 ; Leu et *al.*, 2011 ; Li et *al.*, 2010a ; Schuetz et *al.*, 2009 ; Yang et *al.*, 2010).

Discussion Perspectives

Une CDK4 constitutivement active est capable de coopérer avec *c-myc* dans la lymphomagenèse

Selon la même logique, notre seconde stratégie visait toujours à maintenir l'activité kinase de la phase G1 en amputant la régulation négative à laquelle elle est sujette, mais en ciblant dans ce cas la kinase elle-même. Nous avons utilisé une CDK4 insensible aux INK4 : CDK4^{R24C} (Wölfel et *al.*, 1995). CDK4^{R24C} se comporte comme un oncogène dominant en induisant l'entrée dans le cycle cellulaire et la prolifération indépendamment de toute régulation négative par les INK4. CDK4^{R24C} ne compromet pas l'homéostasie B, mais est capable de collaborer avec *c-myc* pour transformer les cellules B. De plus, comparativement aux souris *c-myc*-3'RR (Truffinet et *al.*, 2007), la présence de CDK4^{R24C} « convertit » le lymphome de Burkitt en un lymphome du manteau (**Manuscrit 3**). En particulier, l'analyse protéique des lymphomes des souris *c-myc*-3'RR/ CDK4^{R24C} par *Western blot* a révélé un taux élevé de complexes cycline D1-CDK4, qui indique une importante rétention nucléaire de la cycline D1 au sein de complexes fonctionnels. Cela confirme l'hypothèse de Gladden, selon laquelle la cycline D1 nucléaire est oncogénique *in vivo* et constitue une étape importante dans la lymphomagenèse du manteau (Gladden et *al.*, 2006).

Nous montrons que la dérégulation de l'axe CDK4-INK4, bien que n'induisant pas de lymphome à elle seule, peut toutefois être impliquée dans la lymphomagenèse dans un contexte de surexpression de *c-myc*. La mutation CDK4^{R24C} constitue un équivalent fonctionnel de la surexpression de la cycline D1 ou de CDK4 et/ou de la délétion des INK4, des dérèglements fréquemment associés à l'émergence du lymphome du manteau, notamment le variant blastoïde (Beà et *al.*, 1999 ; Jares et Campo, 2008). Elle constitue un second « coup oncogénique » qui a un impact sur la lymphomagenèse induite par la seule surexpression de *c-myc*. Ce changement de phénotype peut s'expliquer par l'intervention de mutations secondaires différentes ou qui surviennent à un moment variable ou avec une cinétique différente, après les avantages oncogéniques combinés fournis par la surexpression de l'oncogène *c-myc* et la compromission de l'axe suppresseur de tumeur INK4-CDK4. Ces mutations secondaires altèreraient différents mécanismes physiologiques homéostatiques, éventuellement des mécanismes semblables mais dans un ordre différent et/ou se manifesteraient à des stades de maturation différents. Ainsi, la coopération entre *c-myc* et CDK4 constitutivement active nous a permis d'obtenir un modèle murin réunissant les principales caractéristiques du lymphome du manteau humain. Comparé aux modèles murins précédemment établis (Ford et *al.*, 2007 ; Smith et *al.*, 2006), il semble plus réaliste et pertinent dans son étiologie expérimentale : les dysfonctionnements cellulaires provoqués artificiellement sont plus proches des mutations ou dérégulations susceptibles de survenir spontanément et de favoriser l'émergence naturelle du lymphome. Ce modèle pourra nous aider à comprendre les mécanismes moléculaires

qui sous-tendent la lymphomagenèse du manteau et constitue un outil précieux pour la réalisation d'études pharmacologiques et thérapeutiques.

La défaillance de p53 confirme le rôle oncogénique de *c-myc* et révèle la diversité de son implication dans la lymphomagenèse

Le transfert du transgène *c-myc*-3'RR dans un fond génétique déficient pour p53 a créé un second événement oncogénique qui a permis d'abattre des mécanismes de sécurité et de protection cellulaire additionnels qui restreignaient le potentiel oncogénique de *c-myc*. En levant ces barrières, nous avons induit des conditions qui reflétaient davantage le contexte de la lymphomagenèse *c-myc*-dépendante spontanée (Smith et *al.*, 2010) et avons pu élargir le spectre oncogénique initialement restreint (lymphome de Burkitt) du transgène *c-myc*-3'RR (**Manuscrit 4**). La déficience en p53 favorise l'instabilité génomique, qui favorise à son tour l'acquisition d'autres mutations prédisposant à la transformation. En effet, le cancer est un « processus multi-étape » au cours duquel la cellule acquiert successivement plusieurs mutations qui coopèrent pour lui fournir un pouvoir oncogénique (divisions cellulaires illimitées, inhibition de la différenciation, échappement à la mort cellulaire...) (Chial, 2008).

Les modèles murins ainsi réalisés vont nous permettre d'accroître la compréhension des mécanismes moléculaires et les dysfonctionnements impliqués dans l'émergence des quatre grands types de lymphomes obtenus. En effet, les analyses protéiques et transcriptomiques actuellement en cours de réalisation pourront éventuellement révéler une signature spécifique à chaque phénotype tumoral et identifier des voies de signalisation spécifiquement altérées dans chacun d'eux. Dans ce cas, il pourra être possible de caractériser de nouvelles cibles potentielles sur lesquelles agir dans le cadre d'une démarche thérapeutique. A partir de là pourront être développées des stratégies expérimentales visant à les inhiber si elles sont exacerbées lors du processus malin, ou les amplifier si, au contraire, elles sont mises en silence. Par ailleurs, l'évolution rapide et la pénétrance complète des lymphomes, et le taux de mortalité élevé chez ces souris, font de ce modèle un outil intéressant et avantageux pour les études pharmacologiques, dont l'issue peut se révéler rapidement. Enfin, étant donné le rôle important du BCR et de la stimulation antigénique dans la lymphomagenèse (Young et *al.*, 2008), il serait intéressant de placer ce modèle dans un fond hyporéactif pour vérifier si le potentiel oncogénique du transgène *c-myc*-3'RR peut être compromis. Nous pourrions croiser les souris *c-myc*-3'RR p53+/- avec des souris 3'RR-déficientes qui sont disponibles au laboratoire. Ces souris présentent une forte altération de la transcription germinale et de la commutation de classe vers tous les isotypes, et un défaut d'expression de la chaîne lourde d'immunoglobuline dans les cellules B activées et les plasmocytes (*cf. Annexe 2*).

Annexes

Contribution à l'étude du rôle de la 3'RR dans le développement normal du lymphocyte B

Outre les travaux que nous avons menés sur l'implication de la 3'RR dans le développement pathologique de la cellule B, nous avons également contribué à l'étude de son rôle dans le développement normal du lymphocyte B. Nous avons modestement participé à l'analyse des souris présentant une délétion germinale de l'activateur hs4, ou de l'intégralité du fragment regroupant les quatre activateurs de la 3'RR. La majeure partie de l'expérimentation a été réalisée par le Dr. Christelle Vincent-Fabert dans le cadre de sa thèse de sciences.

Les différents remaniements des segments géniques de chaîne lourde qui ponctuent la vie du lymphocyte B sont contrôlés par les différents éléments *cis*-régulateurs du locus *IgH*. E_{μ} joue un rôle crucial lors des recombinaisons VDJ, mais est très faiblement impliqué dans les phases tardives de la différenciation (Perlot et *al.*, 2005). Au contraire, la cinétique d'activation de la 3'RR suggère qu'elle contribuerait au remaniement tardif des gènes d'immunoglobuline (hypermutation somatique et commutation de classe). Plusieurs observations expérimentales ont permis d'argumenter en faveur de cette hypothèse et ont souligné, en particulier, le rôle de la 3'RR dans la transcription des gènes d'immunoglobuline. Par exemple, la délétion spontanée des activateurs de la 3'RR dans une lignée cellulaire (LP1.2), préservant E_{μ} , provoque une forte diminution de la transcription des gènes constants et un défaut d'expression de la chaîne lourde (Gregor et Morrison, 1986 ; Michaelson et *al.*, 1995). Dans une autre lignée (9921), le remplacement d'hs1,2 par une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*^R) abolit la transcription et l'expression des gènes constants (Liebersohn et *al.*, 1995). Dans cette même lignée, des transgènes « mini-loci » ont permis de mettre en évidence le rôle critique du doublet hs3b-hs4 dans le maintien de la transcription des gènes de chaîne lourde aux stades tardifs du développement B (Shi et Eckhardt, 2001). Plus récemment, une approche de type BAC (chromosome artificiel bactérien) a montré que la 3'RR stimule la transcription germinale des gènes constants et favorise ainsi la commutation de classe (Dunnick et *al.*, 2005, 2009).

Depuis plus de quinze ans, les éléments hs de la 3'RR sont scrutés, individuellement ou en combinaison, pour évaluer leur contribution respective aux processus clés de la maturation B dans un contexte physiologique. Des délétions individuelles des activateurs ont été entreprises, afin de mettre en évidence une éventuelle perte de fonction propre à chacun d'eux. La délétion d'hs3a ou d'hs1,2 n'a aucun impact sur le développement B. Les éléments hs3a et hs1,2 ne sont donc pas indispensables individuellement à la lymphopoïèse B (Manis et *al.*, 1998). En revanche, la délétion

Annexes

combinée d'hs3b et hs4 provoque un défaut sévère de synthèse des immunoglobulines, de transcription germinale et de commutation de classe vers la plupart des isotypes, sauf μ et $\gamma 1$ (Pinaud et *al.*, 2001). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénotype : il peut être dû soit à l'absence d'hs3b seul, soit à l'absence d'hs4 seul, soit à la perte de l'ensemble de la région. Toutefois, trois observations soutiendraient l'implication d'hs4. D'une part, hs3b présente un haut degré de similitude avec hs3a ; or, la délétion d'hs3a seul n'induit aucun phénotype (Manis et *al.*, 1998). D'autre part, hs3b est absent chez l'homme (Mills et *al.*, 1997 ; Pinaud et *al.*, 2001). Enfin, hs4 est actif tout au long du développement B (du stade pro-B au stade plasmocyte) tandis qu'hs3b est actif seulement aux stades tardifs de maturation (cellules B matures et plasmocytes) (Garrett et *al.*, 2005 ; Giambra et *al.*, 2008).

Pour tester cette hypothèse, nous avons supprimé l'élément hs4 par recombinaison homologue (**Annexe 1**). A l'instar de la délétion individuelle des autres éléments hs de la 3'RR, la délétion d'hs4 ne provoque pas de phénotype sévère. Son seul effet notable est une légère diminution de l'expression de l'IgM de surface sur les cellules B de la moelle osseuse et de la rate. Ces travaux soutiennent l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre les différents activateurs de la 3'RR. Des travaux similaires ciblant hs3b ont abouti à la même conclusion (Bébin et *al.*, 2010). Etant donné les synergies transcriptionnelles mises en évidence *in vitro* entre les activateurs 3' et entre les activateurs 3' et E μ (Chauveau et *al.*, 1998 ; Collins et Dunnick, 1999 ; Mocikat et *al.*, 1995 ; Ong et *al.*, 1998), et supposant que de telles synergies existent aussi *in vivo*, la délétion d'un seul activateur (Bébin et *al.*, 2010 ; Manis et *al.*, 1998 ; Vincent-Fabert et *al.*, 2009) maintient la coopération entre les trois autres activateurs présents et intacts. Ces derniers sont suffisants pour assurer une régulation quasi-normale de la transcription des gènes d'immunoglobuline et de la commutation de classe, et compense l'absence du quatrième. En revanche, la perte de deux activateurs (Pinaud et *al.*, 2001) compromet davantage les synergies entre activateurs et « handicape » plus sévèrement le locus. Ainsi, l'effet est d'autant plus drastique que les activateurs délétés sont nombreux.

Nous avons ensuite supprimé le fragment de 30 kb contenant les quatre activateurs de la 3'RR pour analyser l'effet de l'élimination de l'intégralité de ces activateurs sur la transcription, l'expression des gènes d'immunoglobuline et la commutation de classe (**Annexe 2**). En l'absence de la 3'RR, les compartiments B progéniteur et périphérique sont normaux, les capacités de prolifération des cellules B après stimulation et les capacités d'apoptose ne sont pas affectées. En outre, les cellules B peuvent se différencier normalement en plasmoblastes. En revanche, les cellules B déficientes pour la 3'RR souffrent d'une altération sévère de la synthèse des immunoglobulines *in vitro* comme *in vivo*, corrélée à l'abolition de la commutation de classe. La transcription germinale (Ix-

Cx) est différemment affectée selon les isotypes, la production des transcrits hybrides (I_{μ} -Cx) est considérablement diminuée (au-delà d'un facteur 100), de même que la formation des transcrits circulaires excisés (ces deux derniers types de transcrits correspondent au résultat de la réaction de commutation de classe, après la recombinaison entre régions S).

La 3'RR régule donc effectivement la maturation de la cellule B aux stades tardifs. Elle est essentielle pour la commutation de classe et la synthèse d'immunoglobuline. Elle est impliquée dans la transcription germinale des gènes constants et favorise ainsi l'accessibilité des régions S. Néanmoins, en son absence, l'expression de la chaîne lourde, la transcription germinale et la commutation de classe sont très fortement réduites, mais pas totalement abolies. D'autres éléments *cis*-régulateurs semblent impliqués, et coopèreraient avec la 3'RR. Ils pourraient contribuer à la transcription germinale dans les cellules B activées et à la transcription des gènes de chaîne lourde à partir du promoteur pV_H dans les plasmocytes. Ils pourraient aussi expliquer pourquoi l'IgG1 semble moins affectée par la délétion de la 3'RR. E_{μ} est un candidat potentiel, d'autant plus que des interactions physiques ont récemment été mises en évidence entre la 3'RR et E_{μ} dans les cellules B activées ou les plasmocytes (Ju et *al.*, 2007 ; Wuerffel et *al.*, 2007). Lors de la commutation de classe, ces interactions définissent une conformation chromosomique en boucle qui établit un échafaudage favorisant la synapse S-S (Wuerffel et *al.*, 2007).

L'analyse des souris 3'RR-déficientes se poursuit au laboratoire avec l'étude de l'influence de la délétion sur les recombinaisons VDJ et sur l'hypermutation somatique. Un modèle de ciblage et de délétion conjointe de $hs3a$ et $hs1,2$ par recombinaison homologue a également été élaboré, et pourra être comparé au modèle de délétion $hs3b$ - $hs4$ (Pinaud et *al.*, 2001). En particulier, ce dernier induit une diminution de la synthèse d'immunoglobuline et de la commutation de classe impliquant la plupart des isotypes, sauf C_{μ} et $C_{\gamma 1}$. Peut-être l'absence de $hs3a$ et $hs1,2$ affectera-t-elle la production de ces deux isotypes ? Par ailleurs, nous tentons de réaliser, avec Eric Pinaud (CR CNRS) et Marie Marquet (doctorante) la double délétion E_{μ} -3'RR. Nous vérifierons si les processus déjà lourdement affectés par la délétion de la 3'RR, mais maintenus à une légère activité résiduelle (transcription germinale, commutation de classe, expression des gènes de chaîne lourde d'immunoglobuline), sont plus sévèrement atteints, voire même abolis. Peut-être E_{μ} peut-il d'autre part se substituer à la 3'RR, en son absence, pour certaines activités cellulaires, dans le cadre d'une potentielle redondance qui pourra alors être mise en évidence ?

Enfin, jusqu'à présent, toutes les études du rôle régulateur de la 3'RR se sont portées sur les éléments *hs*, activateurs ou isolateurs, et sur leurs fonctions « actives ». Néanmoins, l'une des caractéristiques structurales importantes de la 3'RR, que l'on pourrait qualifier de caractère « passif »,

Annexes

est sa configuration palindromique : hs1,2 est flanqué de part et d'autre par des séquences répétées inversées de 12 kb, qui incluent à leurs extrémités les activateurs hs3a ou hs3b (Chauveau et Cogné, 1996 ; Saleque et *al.*, 1997). Ce grand palindrome pourrait contribuer significativement à la fonctionnalité de la 3'RR. Lorsque l'on ampute la 3'RR d'une partie (délétion hs3b-hs4, Pinaud et *al.*, 2001) ou de la totalité (délétion hs3a-hs1,2-hs3b-hs4, Vincent-Fabert et *al.*, 2010b) du palindrome, on fait apparaître un phénotype. Lors des délétions individuelles (Bébin et *al.*, 2010 ; Manis et *al.*, 1998 ; Vincent-Fabert et *al.*, 2009), l'absence de phénotype pourrait aussi venir du fait que le palindrome n'est pas déstructuré. En effet, les délétions suppriment seulement quelques centaines de pb, laissant intacts plusieurs kb dans les séquences répétées inversées. Afin de comprendre si ces séquences ont un rôle fonctionnel important dans la physiologie de la cellule B, un projet est en cours au laboratoire. Il consiste à ôter la région contenant les deux premiers activateurs (hs3a et hs1,2) et le bras du palindrome entre eux (selon la stratégie décrite plus haut pour la délétion conjointe d'hs3a et hs1,2), puis à réintroduire uniquement le cœur des activateurs dans le locus. Ainsi, la 3'RR conservera ses quatre activateurs, mais aura perdu sa structure palindromique. Ce modèle nous permettra d'évaluer si l'éventuel phénotype observé dans le modèle de délétion de hs3a-hs1,2 cité plus haut est dû seulement à l'absence des activateurs ou à l'absence du palindrome.

Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region.

Christelle Vincent-Fabert, Véronique Truffinet, Rémi Fiancette, Nadine Cogné, Michel Cogné, & Yves Denizot.

The Journal of Immunology, volume 182, numéro 11, pages 6926-6932.

Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes.

Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Eric Pinaud, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné & Yves Denizot.

Blood, volume 116, numéro 11, pages 1895-1898.

Références bibliographiques

A

- Adams J. M. and Cory S., 1992. Oncogene co-operation in leukaemogenesis. *Cancer Surv.* 15: 119-141.
- Adams J. M., Harris A. W., Pinkert C. A., Corcoran L. M., Alexander W. S., Cory S., Palmiter R. D. and Brinster R. L., 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318(6046): 533-538.
- d'Adda di Fagagna F., 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8(7): 512-522.
- d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P. and Jackson S. P., 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426(6963): 194-198.
- Adhikary S. and Eilers M., 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(8): 635-645.
- Adhikary S., Marinoni F., Hock A., Hulleman E., Popov N., Beier R., Bernard S., Quarto M., Capra M., Goettig S., Kogel U., Scheffner M., Helin K. and Eilers M., 2005. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123(3): 409-421.
- Afshar R., Pierce S., Bolland D. J., Corcoran A. and Oltz E. M., 2006. Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'D_{Q52} region in targeting D_HJ_H recombination. *J. Immunol.* 176(4): 2439-2447.
- Aggarwal P., Lessie M. D., Lin D. I., Pontano L., Gladden A. B., Nuskey B., Goradia A., Wasik M. A., Klein-Szanto A. J., Rustgi A. K., Bassing C. H. and Diehl J. A., 2007. Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication. *Genes Dev.* 21(22): 2908-2922.
- Aguilera R. J., Hope T. J. and Sakano H., 1985. Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *EMBO J.* 4(13B): 3689-3693.
- Akkiz H., Sümbül A. T., Bayram S., Bekar A. and Akgöllü E., 2010. MDM2 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to hepatocellular carcinoma in Turkish population. *Cancer Epidemiol.* 34(4): 448-452.
- Alao J. P., 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer* 6:24.
- Albert T., Urlbauer B., Kohlhuber F., Hammersen B. and Eick D., 1994. Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* 9(3): 759-763.
- Albihn A., Johnsen J. I. and Henriksson M. A., 2010. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv. Cancer Res.* 107: 163-224.

Références bibliographiques

Alessandrini A. and Desiderio S. V., 1991. Coordination of immunoglobulin DJ_H transcription and D-to-J_H rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11(4): 2096-2107.

Allen C. D., Okada T. and Cyster J. G., 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2): 190-202.

Allman D and Pillai S., 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20(2): 149-157.

Alt F. W., Blackwell T. K. and Yancopoulos G. D., 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238(4830): 1079-1087.

Alt J. R., Cleveland J. L., Hannink M. and Diehl J. A., 2000. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 14(24): 3102-3114.

Amaral J. D., Xavier J. M., Steer C. J. and Rodrigues C. M., 2010. The Role of p53 in Apoptosis. *Discov. Med.* 9(45): 145-152.

Ambrosini G., Adida C. and Altieri D. C., 1997. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3(8): 917-921.

Arabi A., Wu S., Ridderstråle K., Bierhoff H., Shiue C., Fatyol K., Fahlén S., Hydbring P., Söderberg O., Grummt I., Larsson L. G. and Wright A. P., 2005. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 7(3): 303-310.

Askew D. S., Ashmun R. A., Simmons B. C. and Cleveland J. L., 1991. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6(10): 1915-1922.

Axelsson H., Henriksson M., Wang Y., Magnusson K. P. and Klein G., 1995. The amino-terminal phosphorylation sites of C-MYC are frequently mutated in Burkitt's lymphoma lines but not in mouse plasmacytomas and rat immunocytomas. *Eur. J. Cancer* 31A(12): 2099-2104.

Aydar Y., Sukumar S., Szakal A. K. and Tew J. G., 2005. The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG. *J. Immunol.* 174(9): 5358-5366.

B

Bahram F., von der Lehr N., Cetinkaya C. and Larsson L. G., 2000. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 95(6): 2104-2110.

Banerji J., Olson L. and Schaffner W., 1983. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33(3): 729-740.

Bangs L. A., Sanz I. E. and Teale J. M., 1991. Comparison of D, J_H, and junctional diversity in the fetal, adult, and aged B cell repertoires. *J. Immunol.* 146(6): 1996-2004.

- Barr L. F., Campbell S. E., Diette G. B., Gabrielson E. W., Kim S., Shim H. and Dang C. V., 2000. c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 60(1): 143-149.
- Bassing C. H., Swat W. and Alt F. W., 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109: S45-S55.
- Beà S., Ribas M., Hernández J. M., Bosch F., Pinyol M., Hernández L., García J. L., Flores T., González M., López-Guillermo A., Piris M. A., Cardesa A., Montserrat E., Miró R. and Campo E., 1999. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93(12): 4365-4374.
- Beauséjour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P. and Campisi J., 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22(16): 4212-4222.
- Bébin A.-G., Carrion C., Marquet M., Cogné N., Lecardeur S., Cogné M. and Pinaud E., 2010. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* 184(7): 3710-3717.
- Beckerman R. and Prives C., 2010. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(8): a000935.
- Bemark M. and Neuberger M. S., 2000. The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene* 19(30): 3404-3410.
- Benschop R. J. and Cambier J. C., 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr. Opin. Immunol.* 11(2): 143-151.
- Bertwistle D. and Sherr C. J., 2007. Regulation of the Arf tumor suppressor in E μ -Myc transgenic mice: longitudinal study of Myc-induced lymphomagenesis. *Blood* 109(2): 792-794.
- Besson A., Dowdy S. F. and Roberts J. M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14(2): 159-169.
- Betticher D. C., Thatcher N., Altermatt H. J., Hoban P., Ryder W. D. and Heighway J., 1995. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11(5): 1005-1011.
- Bhatia K., Huppi K., Spangler G., Siwarski D., Iyer R. and Magrath I., 1993. Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat. Genet.* 5(1): 56-61.
- Blackwell T. K., Huang J., Ma A., Kretzner L., Alt F. W., Eisenman R. N. and Weintraub H., 1993. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13(9): 5216-5224.
- Bliskovsky V., Ramsay E. S., Scott J., DuBois W., Shi W., Zhang S., Qian X., Lowy D. R. and Mock B. A., 2003. Frap, FKBP12 rapamycin-associated protein, is a candidate gene for the plasmacytoma resistance locus Pctr2 and can act as a tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(25): 14982-14987.
- Blum K. A., Lozanski G. and Byrd J. C., 2004. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104(10): 3009-3020.

Références bibliographiques

- Bodrug S. E., Warner B. J., Bath M. L., Lindeman G. J., Harris A. W. and Adams J. M., 1994. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 13(9): 2124-2130.
- Bolland D. J., Wood A. L., Afshar R., Featherstone K., Oltz E. M. and Corcoran A. E., 2007. Antisense intergenic transcription precedes *Igh* D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer E μ . *Mol. Cell. Biol.* 27(15): 5523-5533.
- Born W., White J., Kappler J. and Marrack P., 1988. Rearrangement of IgH genes in normal thymocyte development. *J. Immunol.* 140(9): 3228-3232.
- Bossi G. and Sacchi A., 2007. Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy. *Head Neck* 29(3): 272-284.
- Bouchard C., Lee S., Paulus-Hock V., Loddenkemper C., Eilers M. and Schmitt C. A., 2007. FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev.* 21(21): 2775-2787.
- Bouchard C., Marquardt J., Brás A., Medema R. H. and Eilers M., 2004. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 23(14): 2830-2840.
- Boxer L. M. and Dang C. V., 2001. Translocations involving *c-myc* and *c-myc* function. *Oncogene* 20(40): 5595-5610.
- Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A. H., Schlegelberger B., Stein H., Dörken B., Jenuwein T. and Schmitt C. A., 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436(7051): 660-665.
- Brandvold K. A., Neiman P. and Ruddell A., 2000. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. *Oncogene* 19(23): 2780-2785.
- Brenner C., Deplus R., Didelot C., Lorient A., Viré E., De Smet C., Gutierrez A., Danovi D., Bernard D., Boon T., Pelicci P. G., Amati B., Kouzarides T., de Launoit Y., Di Croce L. and Fuks F., 2005. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24(2): 336-346.
- Brown L., Boswell S., Raj L. and Lee S. W., 2007. Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 17(1): 73-85.
- Brown V. D., Phillips R. A. and Gallie B. L., 1999. Cumulative Effect of Phosphorylation of pRB on Regulation of E2F Activity. *Mol. Cell. Biol.* 19(5): 3246-3256.
- Bützler C., Zou X., Popov A. V. and Brüggemann M., 1997. Rapid induction of B-cell lymphomas in mice carrying a human IgH/c-mycYAC. *Oncogene* 14(11): 1383-1388.

C

- Caelles C., Helmberg A; and Karin M., 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370(6486): 220-223.

- Calame K. and Sen R., 2004. Transcription of immunoglobulin genes. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.
- Callén E., Jankovic M., Difilippantonio S., Daniel J. A., Chen H.-T., Celeste A., Pellegrini M., McBride K., Wangsa D., Bredemeyer A. L., Sleckman B. P., Ried T., Nussenzweig M. and Nussenzweig A., 2007. ATM prevents the persistence and propagation of chromosome breaks in lymphocytes. *Cell* 130(1): 63-75.
- Campaner S., Doni M., Hydbring P., Verrecchia A., Bianchi L., Sardella D., Schleker T., Perna D., Tronnorsjö S., Murga M., Fernandez-Capetillo O., Barbacid M., Larsson L. G. and Amati B., 2010a. Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat. Cell Biol.* 12(1): 54-9; sup pp 1-14.
- Campaner S., Doni M., Verrecchia A., Fagà G., Bianchi L. and Amati B., 2010b. Myc, Cdk2 and cellular senescence: Old players, new game. *Cell Cycle* 9(18): 3655-3661.
- Campisi J. et d'Adda di Fagnana F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(9): 729-740.
- Campo E., Raffeld M. and Jaffe E. S., 1999. Mantle-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* 36(2): 115-127.
- Cánepa E. T., Scassa M. E., Ceruti J. M., Marazita M. C., Carcagno A. L., Sirkin P. F. and Ogara M. F., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59(7): 419-426.
- Capoulade C., Bressac-de Paillerets B., Lefrère I., Ronsin M., Feunteun J., Tursz T. and Wiels J., 1998. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 16(12): 1603-1610.
- Casola S., 2007. Control of peripheral B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19(2): 143-149.
- Cesarman E., Dalla-Favera R., Bentley D. and Groudine M., 1987. Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* 238(4831): 1272-1275.
- Chakraborty T., Chowdhury D., Keyes A., Jani A., Subrahmanyam R., Ivanova I. and Sen R., 2007. Repeat organization and epigenetic regulation of the D_H-Cmu domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol. Cell* 27(5): 842-850.
- Chandek C. and Mooi W. J., 2010. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv. Anat. Pathol.* 17(1): 42-48.
- Chaudhuri J. and Alt F. W., 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4(7): 541-552.
- Chauveau C. and Cogné M., 1996. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14(1): 15-16.
- Chauveau C., Pinaud E. and Cogné M., 1998. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28(10): 3048-3056.

Références bibliographiques

- Chen J., Young F., Bottaro A., Stewart V., Smith R. K. and Alt F. W., 1993. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the J_H locus. *EMBO J.* 12(12): 4635-4645.
- Cheng S. W., Davies K. P., Yung E., Beltran R. J., Yu J. and Kalpana G. V., 1999. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat. Genet.* 22(1): 102-105.
- Chial H., 2008. Genetic regulation of cancer. *Nature Education* 1(1).
- Chipuk J. E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D. D., Green D. R., 2005. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309(5741): 1732-1735.
- Chipuk J. E., Maurer U., Green D. R. and Schuler M., 2003. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4(5): 371-381.
- Clark H. M., Yano T., Otsuki T., Jaffe E. S., Shibata D. and Raffeld M., 1994. Mutations in the coding region of c-MYC in AIDS-associated and other aggressive lymphomas. *Cancer Res.* 54(13): 3383-3386.
- Clarke A. R., Purdie C. A., Harrison D. J., Morris R. G., Bird C. C., Hooper M. L. and Wyllie A. H., 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362(6423): 849-852.
- Cogné M. and Birshstein B., 2004. Regulation of class switch recombination. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.
- Cole M. D. and Cowling V. H., 2008. Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(10): 810-815.
- Coqueret O., 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299(1-2): 35-55.
- Corcoran A. E., 2005. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* 17(2): 141-154.
- Coutinho A. and Moller G., 1975. Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv. Immunol.* 21: 113-236.
- Cowling V. H., Chandriani S., Whitfield M. L. and Cole M. D., 2006. A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol. Cell. Biol.* 26(11): 4226-4239.
- Cowling V. H. and Cole M. D., 2006. Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* 16(4): 242-252.
- Cowling V. H. and Cole M. D., 2007. HATs off to capping: a new mechanism for Myc. *Cell Cycle* 6(8): 907-909.
- Cowling V. H. and Cole M. D., 2010. Myc Regulation of mRNA Cap Methylation. *Genes Cancer* 1(6): 576-579.

D

- Dai C. and Gu W., 2010. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 16(11): 528-536.
- Dang C. V., O'Donnell K. A., Zeller K. I., Nguyen T., Osthus R. C. and Li F., 2006. The c-Myc target gene network. *Sem. Cancer Biol.* 16(4): 253-264.
- Dariavach P., Williams G. T., Campbell K., Pettersson S. and Neuberger M. S., 1991. The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur. J. Immunol.* 21(6): 1499-1504.
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K. and Wahl G. M., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8(21): 2540-2551.
- Di Noia J. M. and Neuberger M. S., 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 1-22.
- Dick F. A., 2007. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein – is the whole a sum of its parts? *Cell Div.* 2: 26.
- Dickins R. A., Hemann M. T., Zilfou J. T., Simpson D. R., Ibarra I., Hannon G. J. and Lowe S. W., 2005. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat. Genet.* 37(11): 1289-1295.
- Diehl J. A., Cheng M., Roussel M. F. and Sherr C. J., 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12(22): 3499-3511.
- Diehl J. A., Zindy F. and Sherr C. J., 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11(8): 957-972.
- Difilippantonio M. J., Zhu J., Chen H. T., Meffre E., Nussenzweig M. C., Max E. E., Ried T. and Nussenzweig A., 2000. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404(6777): 510-514.
- Dominguez-Sola D., Ying C. Y., Grandori C., Ruggiero L., Chen B., Li M., Galloway D. A., Gu W., Gautier J. and Dalla-Favera R., 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448(7152): 445-451.
- Dorsett Y., Robbiani D. F., Jankovic M., Reina-San-Martin B., Eisenreich T. R. and Nussenzweig M. C., 2007. A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J. Exp. Med.* 204(9): 2225-2232.
- Duan H., Xiang H., Ma L. and Boxer L. M., 2008. Functional long-range interactions of the IgH 3' enhancers with the bcl-2 promoter region in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 27(53): 6720-6728.
- Dudley D. D., Chaudhuri J., Bassing C. H. and Alt F. W., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86: 43-112.

Références bibliographiques

Dujka M. E., Puebla-Osorio N., Tavana O., Sang M. and Zhu C., 2010. ATM and p53 are essential in the cell-cycle containment of DNA breaks during V(D)J recombination *in vivo*. *Oncogene* 29(7): 957-965.

Dyson N., 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12(15): 2245-2262.

E

Eberhardy S. R. and Farnham P. J., 2001. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J. Biol. Chem.* 276(51): 48562-48571.

Eberhardy S. R. and Farnham P. J., 2002. Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *J. Biol. Chem.* 277(42): 40156-40162.

Eccleston J., Schrader C. E., Yuan K., Stavnezer J. and Selsing E., 2009. Class switch recombination efficiency and junction microhomology patterns in Msh2-, Mlh1-, and Exo1-deficient mice depend on the presence of mu switch region tandem repeats. *J. Immunol.* 183(2): 1222-1228.

Eckhardt L. A. and Birshtein B. K., 1985. Independent immunoglobulin class-switch events occurring in a single myeloma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 5(4): 856-868.

Efeyan A. and Serrano M., 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6(9): 1006-1010.

Eischen C. M., Weber J. D., Roussel M. F., Sherr C. J. and Cleveland J. L., 1999. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 13(20): 2658-2669.

Eischen C. M., Woo D., Roussel M. F. and Cleveland J. L., 2001. Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21(15): 5063-5070.

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., 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1): 119-128.

F

Facchini L. M. and Penn L. Z., 1998. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 12(9): 633-651.

Fairfax K. A., Kallies A., Nutt S. L. and Tarlinton D. M., 2008. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin. Immunol.* 20(1): 49-58.

Featherstone K., Wood A. L., Bowen A. J. and Corcoran A. E., 2010. The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285(13): 9327-9338.

- Feldser D. M. and Greider C. W., 2007. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 11(5): 461-469.
- Felsher D. W. and Bishop J. M., 1999b. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(7): 3940-3944.
- Fiancette R., Amin R., Truffinet V., Vincent-Fabert C., Cogné N., Cogné M. and Denizot Y., 2010. A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies. *Leuk. Res.* 34(8): 1043-1051.
- Finch A., Prescott J., Shchors K., Hunt A., Soucek L., Dansen T. B., Swigart L. B. and Evan G. I., 2006. Bcl-xL gain of function and p19 ARF loss of function cooperate oncogenically with Myc in vivo by distinct mechanisms. *Cancer Cell* 10(2): 113-120.
- Ford R. J., Shen L., Lin-Lee Y. C., Pham L. V., Multani A., Zhou H. J., Tamayo A. T., Zhang C., Hawthorn L., Cowell J. K. and Ambrus J. L. Jr., 2007. Development of a murine model for blastoid variant mantle-cell lymphoma. *Blood* 109(11): 4899-4906.
- Frank K. M., Sharpless N. E., Gao Y., Sekiguchi J. M., Ferguson D. O., Zhu C., Manis J. P., Horner J., DePinho R. A. and Alt F. W., 2000. DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol. Cell* 5(6): 993-1002.
- Fridman J. S. and Lowe S. W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56): 9030-9040.
- Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T. and Pestell R. G., 2004. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145(12): 5439-5447.

G

- Gaidano G., Carbone A., Pastore C., Capello D., Migliazza A., Gloghini A., Roncella S., Ferrarini M., Saglio G. and Dalla-Favera R., 1997. Frequent mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89(10): 3755-3762.
- Garcia-Conde J. and Cabanillas F., 1996. Mantle cell lymphoma: a lymphoproliferative disorder associated with aberrant function of the cell cycle. *Leukemia* 10 Suppl 2:s78-83.
- Garrett F. E., Emelyanov A. V., Sepulveda M. A., Flanagan P., Volpi S., Li F., Loukinov D., Eckhardt L. A., Lobanenkova V. V. and Birshstein B. K., 2005. 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(4): 1511-1525.
- Gartel A. L. and Shchors K., 2003. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp. Cell Res.* 283(1): 17-21.
- Gaudin E., Hao Y., Rosado M. M., Chaby R., Girard R. and Freitas A. A., 2004. Positive selection of B cells expressing low densities of self-reactive BCRs. *J. Exp. Med.* 199(6): 843-853.
- Genovese C., Trani D., Caputi M. and Claudio P. P., 2006. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene* 25(38): 5201-5209.

Références bibliographiques

- Giacinti C. and Giordano A., 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25(38): 5220-5227.
- Giallourakis C. C., Franklin A., Guo C., Cheng H. L., Yoon H. S., Gallagher M., Perlot T., Andzelm M., Murphy A. J., MacDonald L. E., Yancopoulos G. D. and Alt F. W., 2010. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(51): 22207-22212.
- Giannini S. L., Singh M., Calvo C. F., Ding G. and Birshstein B. K., 1993. DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol.* 150(5): 1772-1780.
- Gillies S. D., Morrison S. L., Oi V. T. and Tonegawa S., 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33(3): 717-728.
- Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J. M. and Dulic V., 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 23(13): 2554-2563.
- Gladden A. B. and Diehl J. A., 2005. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J. Cell. Biochem.* 96(5): 906-913.
- Gladden A. B., Woolery R., Aggarwal P., Wasik M. A. and Diehl J. A., 2006. Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene* 25(7): 998-1007.
- Goh A. M., Coffill C. R. and Lane D. P., 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* 223(2): 116-126.
- Gomez-Roman N., Grandori C., Eisenman R. N. and White R. J., 2003. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421(6920): 290-294.
- Goodnow C. C., Adelstein S. and Basten A., 1990. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 248(4961): 1373-1379.
- Gordon M. S., Kanegai C. M., Doerr J. R. and Wall, R., 2003. Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalpha, CD79a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(7): 4126-4131.
- Gorgoulis V. G., Zacharatos P., Kotsinas A., Kletsas D., Mariatos G., Zoumpourlis V., Ryan K. M., Kittas C. and Papavassiliou A. G., 2003. p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J.* 22(7): 1567-1578.
- Grandori C., Cowley S. M., James L. P. and Eisenman R. N., 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 653-699.
- Grandori C., Gomez-Roman N., Felton-Edkins Z. A., Ngouenet C., Galloway D. A., Eisenman R. N. and White R. J., 2005. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* 7(3): 311-318.
- Grandori C., Wu K. J., Fernandez P., Ngouenet C., Grim J., Clurman B. E., Moser M. J., Oshima J., Russell D. W., Swisshelm K., Frank S., Amati B., Dalla-Favera R. and Monnat R. J. Jr., 2003. Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence. *Genes Dev.* 17(13): 1569-1574.

- Green D. R. and Kroemer G., 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458(7242): 1127-1130.
- Gregory M. A. and Hann S. R., 2000. c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 20(7): 2423-2435.
- Grewal S. S., Li L., Orian A., Eisenman R. N. and Edgar B. A., 2005. Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat. Cell Biol.* 7(3): 295-302.
- Griesmann H., Schlereth K., Krause M., Samans B. and Stiewe T., 2009. p53 and p73 in suppression of Myc-driven lymphomagenesis. *Int. J. Cancer* 124(2): 502-506.
- Guidos C. J., Williams C. J., Grandal I., Knowles G., Huang M. T. and Danska J. S., 1996. V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev.* 10(16): 2038-2054.
- Guikema J. E., Linehan E. K., Tsuchimoto D., Nakabeppu Y., Strauss P. R., Stavnezer J. and Schrader C. E., 2007. APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 204(12): 3017-3026.

H

- Haas K. M., Poe J. C., Steeber D. A. and Tedder T. F., 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23(1): 7-18.
- Haber J. E., 2008. Alternative endings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(2): 405-406.
- Hann S. R., 2006. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin. Cancer Biol.* 16(4): 288-302.
- Hardy R. R., Carmack C. E., Shinton S. A., Kemp J. D. and Hayakawa K., 1991. Resolution and characterisation of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173(5): 1213-1225.
- Hardy R. R., Kincade P. W. and Dorshkind K., 2007. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26(6): 703-714.
- Hardy R. R. and Hayakawa K., 2001. B cell developmeny pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 595-621.
- Harley C. B., Futcher A. B. and Greider C. W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274): 458-460.
- Harris S. L. and Levine A. J., 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17): 2899-2908.
- Hatakeyama M. Brill J. A., Fink G. R. and Weinberg R. A., 1994. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 8(15): 1759-1771.
- Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K. H. and Oren M., 1995. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9(17): 2170-2183.

Références bibliographiques

- Hayflick L., 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37: 614-636.
- Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P., Chen D. J. and Sedivy J. M., 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21^{CIP1}, but not p16^{INK4a}. *Mol. Cell* 14(4): 501-513.
- Hermeking H., Rago C., Schuhmacher M., Li Q., Barrett J. F., Obaya A. J., O'Connell B. C., Mateyak M. K., Tam W., Kohlhuber F., Dang C. V., Sedivy J. M., Eick D., Vogelstein B. and Kinzler K. W., 2000. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(5): 2229-2234.
- Hernández L., Hernández S., Beà S., Pinyol M., Ferrer A., Bosch F., Nadal A., Fernández P. L., Palacín A., Montserrat E. and Campo E., 1999. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 13(12): 2087-2093.
- Herzog S., Reth M. and Jumaa H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3): 195-205.
- Heyne K., Schmitt K., Mueller D., Armbruster V., Mestres P. and Roemer K., 2008. Resistance of mitochondrial p53 to dominant inhibition. *Mol. Cancer* 7: 54.
- Holthausen J. T., Wyman C. and Kanaar R., 2010. Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair (Amst.)* 9(12): 1264-1272.
- Hong S., Pusapati R. V., Powers J. T. and Johnson D. G., 2006. Oncogenes and the DNA damage response: Myc and E2F1 engage the ATM signaling pathway to activate p53 and induce apoptosis. *Cell Cycle* 5(8): 801-803.
- Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004. Molecular biology of B cells. *Elsevier Academic Press*.
- Hsu B., Marin M. C., el-Naggar A. K., Stephens L. C., Brisbay S. and McDonnell T. J., 1995. Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. *Oncogene* 11(1): 175-179.
- Hunter T., 1991. Cooperation between oncogenes. *Cell* 64(2): 249-270.
- Hydbring P., Bahram F., Su Y., Tronnorsjö S., Högstrand K., von der Lehr N., Sharifi H. R., Lilischkis R., Hein N., Wu S., Vervoorts J., Henriksson M., Grandien A., Lüscher B. and Larsson L. G., 2010. Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(1): 58-63.
- Hydbring P. and Larsson L. G., 2010a. Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc. *Aging (Albany NY)* 2(4): 244-250.
- Hydbring P. and Larsson L. G., 2010b. Tipping the balance: Cdk2 enables Myc to suppress senescence. *Cancer Res.* 70(17): 6687-6691.



Imai K., Slupphaug G., Lee W. I., Revy P., Nonoyama S., Catalan N., Yel L., Forveille M., Kavli B., Krokan H. E., Ochs H. D., Fischer A. and Durandy A, 2003. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 4(10): 1023-1028.

J

Jacobs J. J. and de Lange T., 2004. Significant role for p16^{INK4a} in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* 14(24): 2302-2308.

Jacobs J. J., Scheijen B., Voncken J. W., Kieboom K., Berns A. and van Lohuizen M., 1999. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* 13(20): 2678-2690.

Jankovic M., Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2007. Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nat. Immunol.* 8(8): 801-808.

Jankovic M., Robbiani D. F., Dorsett Y., Eisenreich T., Xu Y., Tarakhovsky A., Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2010. Role of the translocation partner in protection against AID-dependent chromosomal translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(1): 187-192.

Janz A., Seignani C., Kenyon K., Ngo C. V. and Thomas-Tikhonenko A., 2000. Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Res.* 28(11): 2268-2275.

Janz S., 2006. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10): 1213-1224.

Janz S., 2008. Genetic and environmental cofactors of Myc translocations in plasma cell tumor development in mice. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* (39): 37-40.

Jares P. and Campo E., 2008. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 142(2): 149-165.

Jiang P., Du W., Heese K. and Wu M., 2006. The bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 26(23): 9071-9082.

Johnston J. M. and Carroll W. L., 1992. c-myc hypermutation in Burkitt's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 8(6): 431-439.

Johnston J. M., Yu M. T. and Carroll W. L., 1991. c-myc hypermutation is ongoing in endemic, but not all Burkitt's lymphoma. *Blood* 78(9): 2419-2425.

Jorgenson T. C., Williams B. R., Wendland A., Bilger A., Sandgren E. P. and Drinkwater N. R., 2010. Identification of susceptibility loci in a mouse model of KRASG12D-driven pancreatic cancer. *Cancer Res.* 70(21): 8398-8406.

Ju Z., Volpi S. A., Hassan R., Martinez N., Giannini S. L., Gold T. and Birshtein B. K., 2007. Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* 282(48): 35169-35178.

Références bibliographiques

Jung D., Giallourakis C., Mostoslavsky R. and Alt F. W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 541-570.

K

Kakudo Y., Shibata H., Otsuka K., Kato S. and Ishioka C., 2005. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* 65(6): 2108-2114.

Kantor A., 1991. A new nomenclature for B cells. *Immunol. Today* 12(11): 388.

Karasuyama H., Rolink A. and Melchers F., 1996. Surrogate light chain in B cell development. *Adv. Immunol.* 63: 1-41.

Khamlichi A. A., Pinaud E., Decourt C., Chauveau C. and Cogné M., 2000. The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv. Immunol.* 75: 317-345.

Kim J. K. and Diehl J. A., 2009. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* 220(2): 292-296.

Kim S. Y., Herbst A., Tworkowski K. A., Salghetti S. E. and Tansey W. P., 2003. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol. Cell* 11(5): 1177-1188.

Klapproth K. and Wirth T., 2010. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br. J. Haematol.* 149(4): 484-497.

Klein G., 1986. Constitutive activation of oncogenes by chromosomal translocations in B-cell derived tumors. *AIDS Res.* 2 Suppl 1: S167-76.

Klein S., Sablitzky F. and Radbruch A., 1984. Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J.* 3(11): 2473-2476.

Klein U. and Dalla-Favera R., 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 8(1): 22-33.

Knudsen K. E., 2006. The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Div.* 1: 15.

Knudsen K. E., Diehl J. A., Haiman C. A. and Knudsen E. S., 2006. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 25(11): 1620-1628.

Kottmann A. H., Zevnik B., Welte M., Nielsen P. J. and Köhler G., 1994. A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* 24(4): 817-821.

Kruse J. P. and Gu W., 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137(4): 609-622.

Kumararatne D. S. and MacLennan I. C., 1982. The origin of marginal-zone cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 149: 83-90.

Küppers R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5(4): 251-262.

Kurosaki T., 2010. B-lymphocyte biology. *Immunol. Rev.* 237(1): 5-9.

Kuschak T. I., Taylor C., McMillan-Ward E., Israels S., Henderson D. W., Mushinski J. F., Wright J. A. and Mai S., 1999. The ribonucleotide reductase R2 gene is a non-transcribed target of c-Myc-induced genomic instability. *Gene* 238(2): 351-365.

L

Land H., Parada L. F. and Weinberg R. A., 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304(5927): 596-602.

Larsson L. G. and Henriksson M. A., 2010. The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp. Cell Res.* 316(8): 1429-1437.

LeBien T. W., 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96(1): 9-23.

LeBien T. W. and Tedder T. F., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112(5): 1570-1580.

Lee M.-H. and Yang H.-Y., 2001. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 58(12-13): 1907-1922.

Lefranc M.-P. and Lefranc G., 2004. Immunoglobulin lambda (IGL) genes of human and mouse. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.

Lenz G. and Staudt L., 2010. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 362(15): 1417-1429.

Leu J. D., Wang C. Y., Tsai H. Y., Lin I. F., Chen R. C. and Lee Y. J., 2011. Involvement of p53 R72P polymorphism in the association of MDM2-SNP309 with breast cancer. *Oncol. Rep.* 25(6): 1755-1763.

Levine A. J. and Oren M., 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9(10): 749-758.

Li F., Sturgis E. M., Chen X., Zafereo M. E., Wei Q. and Li G., 2010a. Association of p53 codon 72 polymorphism with risk of second primary malignancy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 116(10): 2350-2359.

Li F., Yan Y., Pieretti J., Feldman D. A., Eckhardt L. A., 2010b. Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for Eμ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol.* 185(10): 6049-6057.

Li Q. and Dang C. V., 1999. c-Myc overexpression uncouples DNA replication from mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 19(8): 5339-5351.

Li Y. S., Wasserman R., Hayakawa K. and Hardy R. R., 1996. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5(6): 527-535.

Références bibliographiques

- Lieber M. R., 2010a. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17(4): 393-395.
- Lieber M. R., 2010b. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 181-211.
- Lieber M. R., Yu K. and Raghavan S. C., 2006. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10): 1234-1245.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragozcy T., Telling A., Amit I., Lajoie B. R., Sabo P. J., Dorschner M. O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M. A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L. A., Lander E. S. and Dekker J., 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326(5950): 289-293.
- Lieberson R., Giannini S. L., Birshstein B. K. and Eckhardt L. A., 1991. An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* 19(4): 933-937.
- Lindström M. S., Klangby U. and Wiman K. G., 2001. p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene* 20(17): 2171-2177.
- Liu E., Li X., Yan F., Zhao Q. and Wu X., 2004. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J. Biol. Chem.* 279(17): 17283-17288.
- Liu F. and Matsuura I., 2005. Inhibition of Smad antiproliferative function by CDK phosphorylation. *Cell Cycle* 4(1):63-66.
- Liu M., Duke J. L., Richter D. J., Vinuesa C. G., Goodnow C. C., Kleinstein S. H., Schatz D. G., 2008. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451(7180): 841-845.
- Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres R., Lamers M. C. and Carsetti R., 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190(1): 75-89.
- Lopes-Carvalho T. and Kearney J. F., 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 197: 192-205.
- Lovec H., Grzeschiczek A., Kowalski M. B. and Möröy T., 1994. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13(15): 3487-3495.
- Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A. and Jacks T., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362(6423): 847-849.
- Lu F., Gladden A. B. and Diehl J. A., 2003. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res.* 63(21): 7056-7061.
- Lundberg A. S. and Weinberg R. A., 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18(2): 753-761.

M

- Madisen L. and Groudine M., 1994. 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(18): 2212-2226.
- Mai S., Fluri M., Siwarski D. and Huppi K., 1996a. Genomic instability in MycER-activated Rat1A-MycER cells. *Chromosome Res.* 4(5): 365-371.
- Mai S., Hanley-Hyde J. and Fluri M., 1996b. c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene* 12(2): 277-288.
- Mai S., Hanley-Hyde J., Rainey G. J., Kuschak T. I., Paul J. T., Littlewood T. D., Mischak H., Stevens L. M., Henderson D. W. and Mushinski J. F., 1999. Chromosomal and extrachromosomal instability of the cyclin D2 gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* 1(3): 241-252.
- Malumbres M. and Barbacid M., 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1(3): 222-231.
- Malumbres M., Pérez De Castro I., Hernández M. I., Jiménez M., Corral T. and Pellicer A., 2000. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15^{INK4b}. *Mol. Cell. Biol.* 20(8): 2915-2925.
- Manis J. P., van der Stoep N., Tian M., Ferrini R., Davidson L., Bottaro A. and Alt F. W., 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188(8): 1421-1431.
- Manjarrez-Orduno N., Quach T. D. and Sanz I., 2009. B cells and immunological tolerance. *J. Invest. Dermatol.* 129(2): 278-288.
- Mao D. Y., Barsyte-Lovejoy D., Ho C. S., Watson J. D., Stojanova A. and Penn L. Z., 2004. Promoter-binding and repression of PDGFRB by c-Myc are separable activities. *Nucleic Acids Res.* 32(11): 3462-3468.
- 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., 2003. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr. Biol.* 13(10): 882-886.
- Marchenko N. D., Zaika A. and Moll U. M., 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signalling. *J. Biol. Chem.* 275(21): 16202-16212.
- Marculescu R., Vanura K., Montpellier B., Roulland S., Le T., Navarro J.-M., Jäger U., McBlane F. and Nadel B., 2006. Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: Targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10): 1246-1258.
- Mårtensson I.-L., Rolink A., Melchers F., Mundt C., Licence S. and Shimizu T., 2002. The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion. *Semin. Immunol.* 14(5): 335-342.
- Matsuda F., 2004. Human immunoglobulin heavy chain locus. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.

Références bibliographiques

- Matsushime H., Roussel M. F., Ashmun R. A. and Sherr C. J., 1991. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65(4): 701-713.
- Matsuura I., Denissova N. G., Wang G., He D., Long J. and Liu F., 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 430(6996): 226-231.
- Matthias P. and Baltimore D., 1993. The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol. Cell. Biol.* 13(3): 1547-1553.
- Maul R. W. and Gearhart P. J., 2010a. AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* 105:159-191.
- Maul R. W. and Gearhart P. J., 2010b. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. *Immunol. Res.* 47(1-3): 113-122.
- McDonnell T. J., Deane N., Platt F. M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J. P. and Korsmeyer S. J., 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57(1): 79-88.
- Mebius R. E. and Kraal G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8): 606-616.
- Meek D. W., 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* 9(10): 714-723.
- Meek D. W. and Anderson C. W., 2009. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1(6):a000950.
- Meek K. D., Hasemann C. A. and Capra J. D., 1989. Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. *J. Exp. Med.* 170(1): 39-57.
- Meffre E., Casellas R. and Nussenzweig M. C., 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1(5): 379-385.
- Menendez D., Inga A. and Resnick M. A., 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer* 9(10): 724-737.
- Menssen A. and Hermeking H., 2002. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9): 6274-6279.
- Merrell K. T., Benschop R. J., Gault S. B., Aviszus K., Decote-Ricardo D., Wysocki L. J. and Cambier J. C., 2006. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25(6): 953-962.
- Meyer N. and Penn L. Z., 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* 8(12): 976-990.
- Michaelson J. S., Giannini S. L. and Birshstein B. K., 1995. Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 23(6): 975-981.

- Migliazza A., Martinotti S., Chen W., Fusco C., Ye B. H., Knowles D. M., Offit K., Chaganti R. S., Dalla-Favera R., 1995. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(26): 12520-12524.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U. M., 2003. p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Mol. Cell* 11(3): 577-590.
- Min I. M. and Selsing E., 2005. Antibody class switch recombination: roles for switch sequences and mismatch repair proteins. *Adv. Immunol.* 87: 297-328.
- Minn A. J., Boise L. H. and Thompson C. B., 1996. Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev.* 10(20): 2621-2631.
- Monson N. L., 2008. The natural history of B cells. *Curr. Opin. Neurol.* 21(Suppl.1): S3-S8.
- Morgan D. O., 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291.
- Morgan D. O., 2007. The Cell Cycle, principles of control. *Oxford University Press*.
- Mostoslavsky R., Alt F. W. and Rajewsky K., 2004. The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion. *Cell* 118(5): 539-544.
- Motokura T., Bloom T., Kim H. G., Jüppner H., Ruderman J. V., Kronenberg H. M. And Arnold A., 1991. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350(6318): 512-515.
- Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y. and Honjo T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5): 553-563.
- Müller J. R., Janz S., Goedert J. J., Potter M. and Rabkin C. S., 1995. Persistence of immunoglobulin heavy chain/c-myc recombination-positive lymphocyte clones in the blood of human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(14): 6577-6581.
- Muramatsu M., Sankaranand V. S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N. O. and Honjo T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274(26): 18470-18476.
- Müschen M., Re D., Jungnickel B., Diehl V., Rajewsky K. and Küppers R., 2000. Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J. Exp. Med.* 192(12):1833-1840.

N

- Nambu Y., Sugai M., Gonda H., Lee C. G., Katakai T., Agata Y., Yokota Y. and Shimizu A., 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302(5653): 2137-2140.
- Nesbit C. E., Tersak J. M. and Prochownik E. V., 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18(19): 3004-3016.

Références bibliographiques

- Neuberger M. S., 1983. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *EMBO J.* 2(8): 1373-1378.
- Neuberger M. S. and Calabi F., 1983. Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* 305(5931): 240-243.
- Ngo C. V., Gee M., Akhtar N., Yu D., Volpert O., Auerbach R. and Thomas-Tikhonenko A, 2000. An *in vivo* function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth Differ.* 11(4): 201-210.
- Nickerson K. G., Berman J., Glickman E., Chess L. and Alt F. W., 1989. Early human IgH gene assembly in Epstein-Barr virus-transformed fetal B cell lines. Preferential utilization of the most JH-proximal D segment (DQ52) and two unusual VH-related rearrangements. *J. Exp. Med.* 169(4): 1391-1403.
- Nitschke L., Kestler J., Tallone T., Pelkonen S. and Pelkonen J., 2001. Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* 166(4): 2540-2552.
- Nowell P. and Hungerford D., 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.
- Nowell P. C. and Hungerford D. A., 1961. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 27:1013-1035.
- Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2010. Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer. *Cell* 141(1): 27-38.

O

- Oettinger M. A., Schatz D. G., Gorka C. and Baltimore D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248(4962): 1517-1523.
- Oliver A. M., Martin F. and Kearney J. F., 1999. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* 162(12): 7198-7207.
- Ollila J. and Vihinen M., 2005. B cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37(3): 518-523.
- Ong J., Stevens S., Roeder R. G. and Eckhardt L. A., 1998. 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol.* 160(10): 4896-4903.
- Osborne C. S., Chakalova L., Mitchell J. A., Horton A., Wood A. L., Bolland D. J., Corcoran A. E. and Fraser P., 2007. *Myc* dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by *IgH*. *PLoS Biol.* 5(8): e192.
- Osmond D. G., Rolink A. and Melchers F., 1998. Murine B lymphopoiesis: toward a unified model. *Immunol. Today* 19(2): 65-68.

Oster S. K., Ho C. S., Soucie E. L. and Penn L. Z., 2002. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv. Cancer Res.* 84: 81-154.

P

Palomo C., Zou X., Nicholson I.C., Bützler C. and Brüggemann M., 1999. 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(21): 5625-5628.

Parant J. M. and Lozano G., 2003. Disrupting TP53 in mouse models of human cancers. *Hum. Mutat.* 21(3): 321-326.

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., 2005a. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res.* 65(4): 1306-1315.

Park S. S., Shaffer A. L., Kim J. S., duBois W., Potter M., Staudt L. M. and Janz S., 2005b. Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res.* 65(17): 7644-7652.

Parrens M., Belaud-Rotureau M.-A., Fitoussi O., Carerre N., Bouabdallah K., Marit G., Dubus P., de Mascarel A. and Merlio J.-P., 2006. Blastoid and common variants of mantle cell lymphoma exhibit distinct immunophenotypic and interphase FISH features. *Histopathology* 48(4): 353-362.

Pasqualucci L., Bhagat G., Jankovic M., Compagno M., Smith P., Muramatsu M., Honjo T., Morse III H. C., Nussenzweig M. C. and Dalla-Favera R., 2008. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* 40(1): 108-112.

Pasqualucci L., Migliazza A., Fracchiolla N., William C., Neri A., Baldini L., Chaganti R. S., Klein U., Küppers R., Rajewsky K., Dalla-Favera R., 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(20): 11816-11821.

Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T., Nanjangud G., Chaganti R. S., Küppers R. and Dalla-Favera R., 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412(6844): 341-346.

Pauklin S., Kristjuhan A., Maimets T. and Jaks V., 2005. ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(2): 386-394.

Pawlitzky I., Angeles C. V., Siegel A. M., Stanton M. L., Riblet R. and Brodeur P. H., 2006. Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J. Immunol.* 176(11): 6839-6851.

Peled J. U., Kuang F. L., Iglesias-Ussel M. D., Roa S., Kalis S. L., Goodman M. F. and Scharff M. D., 2008. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 481-511.

Pelengaris S. and Khan M., 2003. The many faces of c-MYC. *Arch. Biochem. Biophys.* 416(2): 129-136.

Références bibliographiques

- Pelengaris S., Khan M. and Evan G., 2002a. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2(10): 764-776.
- Pelengaris S., Khan M. and Evan G. I., 2002b. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109(3): 321-334.
- Pelengaris S., Littlewood T., Khan M., Elia G. and Evan G., 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol. Cell* 3(5): 565-577.
- Pérez-Galán P., Dreyling M. and Wiestner A., 2011. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117(1): 26-38.
- Perkins A. S. and Friedberg J. W., 2008. Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2008: 341-348.
- Perkins E. J., Nair A., Cowley D. O., Van Dyke T., Chang Y. and Ramsden D. A., 2002. Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev.* 16(2): 159-164.
- Perlot T. and Alt F. W., 2008. Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* 99: 1-32.
- Perlot T., Alt F. W., Bassing C. H., Suh H. and Pinaud E., 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(40): 14362-14367.
- Perlot T., Pawlitzky I., Manis J. P., Zarrin A. A., Brodeur P. H. and Alt F. W., 2010. Analysis of mice lacking DNaseI hypersensitive sites at the 5' end of the IgH locus. *PLoS One* 5(11): e13992.
- Pinaud E., Marquet M., Fiancette R., Péron S., Vincent-Fabert C., Denizot Y. and Cogné M., 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* In press.
- Post S. M., Quintás-Cardama A., Terzian T., Smith C., Eischen C. M. and Lozano G., 2010. p53-dependent senescence delays E μ -myc-induced B-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 29(9): 1260-1269.
- Potter M., Pumphrey J. G. and Bailey D. W., 1975. Genetics of susceptibility to plasmacytoma induction. I. BALB/cAnN (C), C57BL/6N (B6), C57BL/Ka (BK), (C times B6)F1, (C times BK)F1, and C times B recombinant-inbred strains. *J. Natl. Cancer Inst.* 54(6): 1413-1417.
- Poznic M., 2009. Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J. Biosci.* 34(2): 305-312.
- Prochownik E. V. and Li Y., 2007. The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* 6(9): 1024-1029.
- 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., 2006. ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(5): 1446-1451.

R

- Raab M. S., Podar K., Breitkreutz I., Richardson P. G. and Anderson K. C., 2009. Multiple myeloma. *Lancet* 374(9686): 324-339.
- Rabbitts T. H., Forster A., Hamlyn P. and Baer R., 1984. Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma. *Nature* 309(5969): 592-597.
- Rabbitts T. H., Hamlyn P. H. and Baer R., 1983. Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 306(5945): 760-765.
- Rada C., Williams G. T., Nilsen H., Barnes D. E., Lindahl T., Neuberger M. S., 2002. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* 12(20): 1748-1755.
- Raff M. C., Feldmann M. and de Petris S., 1973. Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 137(4): 1024-1030.
- Raghavan S. C., Chastain P., Lee J. S., Hedge B. G., Houston S., Langen R., Hsieh C.-L., Haworth I. S. and Lieber M. R., 2005a. Evidence for a triplex DNA conformation at the bcl-2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation. *J. Biol. Chem.* 280(24): 22749-22760.
- Raghavan S. C., Gu J., Swanson P. C. and Lieber M. R., 2007. The structure-specific nicking of small heteroduplexes by the RAG complex: implications for lymphoid chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 6(6): 751-759.
- Raghavan S. C., Swanson P. C., Ma Y. and Lieber M. R., 2005b. Double-strand break formation by the RAG complex at the bcl-2 major breakpoint region and at other non-B DNA structures in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 25(14): 5904-5919.
- Raghavan S. C., Swanson P. C., Wu X., Hsieh C.-L. and Lieber M. R., 2004. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 428(6978): 88-93.
- Ramiro A. R., Jankovic M., Callen E., Difilippantonio S., Chen H. T., McBride K. M., Eisenreich T. R., Chen J., Dickins R. A., Lowe S. W. and Nussenzweig A., 2006. Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440(7080): 105-109.
- Ramiro A. R., Jankovic M., Eisenreich T., Difilippantonio S., Chen-Kiang S., Muramatsu M., Honjo T., Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2004. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118(4): 431-438.
- Rane S. G., Cosenza S. C., Mettus R. V. and Reddy E. P., 2002. Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* 22(2): 644-656.
- Reddy M. C. and Vasquez K. M., 2005. Repair of genome destabilizing lesions. *Radiat. Res.* 164(4 Pt 1): 345-356.
- Reth M. G., Jackson S. and Alt F. W., 1986. V_HDJ_H formation and DJ_H replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. *EMBO J.* 5(9): 2131-2138.
- Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Labelouse R., Gennery A., Tezcan I., Ersoy F., Kayserili H., Ugazio A. G., Brousse N., Muramatsu M., Notarangelo L. D., Kinoshita K., Honjo T., Fischer A. and Durandy A., 2000. Activation-

Références bibliographiques

- induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102(5): 565-575.
- Riblet R., 2004. Immunoglobulin heavy chain genes of mouse. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.
- Riley T., Sontag E., Chen P. and Levine A., 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9(5): 402-412.
- Robbiani D. F., Bothmer A., Callen E., eina-San-Martin B., Dorsett Y., Difilippantonio S., Bolland D. J., Chen H. T., Corcoran A. E., Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2008. AID is required for the chromosomal breaks in *c-myc* that lead to *c-myc/IgH* translocations. *Cell* 135(6): 1028-1038.
- Robbiani D. F., Bunting S., Feldhahn N., Bothmer A., Camps J., Deroubaix S., McBride K. M., Klein I. A., Stone G., Eisenreich T. R., Ried T., Nussenzweig A. and Nussenzweig M. C., 2009. AID produces DNA double-strand breaks in non-*Ig* genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol. Cell* 36(4): 631-641.
- Rolink A. G., Andersson J. and Melchers F., 2004. Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol. Rev.* 197: 41-50.
- Roman E. and Smith A. G., 2011. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 58(1): 4-14.
- Rooney S., Chaudhuri J. and Alt F., 2004. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol. Rev.* 200: 115-131.
- Ryan K. M. and Birnie G. D., 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J.* 314 (Pt 3): 713-721.

S

- Sakai E., Bottaro A. and Alt F. W., 1999a^o. The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int. Immunol.* 11(10): 1709-1713.
- Sakai E., Bottaro A., Davidson L., Sleckman B. P. and Alt F. W., 1999b. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(4): 1526-1531.
- Saleque S., Singh M., Little R. D., Giannini S. L., Michaelson J. S. and Birshtein B. K., 1997. Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C α 3'E and hs3). *J. Immunol.* 158(10): 4780-4787.
- Samitas K., Lötval J. and Bossios A., 2010. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 58(3): 209-225.
- Sarek G., Kurki S., Enbäck J., Iotzova G., Haas J., Laakkonen P., Laiho M. and Ojala P. M., 2007. Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J. Clin. Invest.* 117(4): 1019-1028.

- Schatz D. G., 2004. V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* 200: 5-11.
- Schatz D. G., Oettinger M. A. and Baltimore D., 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59(6): 1035-1048.
- Schlissel M., Voronova A. and Baltimore D., 1991b. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev.* 5(8): 1367-1376.
- Schlissel M. S., Corcoran L. M. and Baltimore D., 1991a. Virus-transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J. Exp. Med.* 173(3): 711-720.
- Schmidt E. V., 2004. The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* 23(18): 3217-3221.
- Schmitt C. A., McCurrach M. E., de Stanchina E., Wallace-Brodeur R. R. and Lowe S. W., 1999. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev.* 13(20): 2670-2677.
- Schofield R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.
- Schrader C. E., Edelmann W., Kucherlapati R. and Stavnezer J., 1999. Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes. *J. Exp. Med.* 190(3): 323-330.
- Schrader C. E., Guikema J. E., Linehan E. K., Selsing E. and Stavnezer J., 2007. Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. *J. Immunol.* 179(9): 6064-6071.
- Schrader C. E., Linehan E. K., Mochegova S. N., Woodland R. T., Stavnezer J., 2005. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* 202(4): 561-568.
- Schroeder H. W. Jr. and Cavacini L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2 Suppl 2): S41-S52.
- Schroeder H. W. Jr. and Wang J. Y., 1990. Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(16): 6146-6150.
- Schuetz J. M., MacArthur A. C., Leach S., Lai A. S., Gallagher R. P., Connors J. M., Gascoyne R. D., Spinelli J. J. and Brooks-Wilson A. R., 2009. Genetic variation in the NBS1, MRE11, RAD50 and BLM genes and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *BMC Med. Genet.* 10: 117.
- Sekiguchi J. M. and Fergusson D. O., 2006. DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* 124(2): 260-262.
- Semenza G. L., 2002. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern. Med.* 41(2): 79-83.
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D. and Lowe S. W., 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell* 88(5): 593-602.

Références bibliographiques

- Shackleton M., Quintana E., Fearon E. R. and Morrison S. J., 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138(5): 822-829.
- Shaffer A. L., Rosenwald A. and Staudt L. M., 2002. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12): 920-932.
- Shan J., Zhao W. and Gu W., 2009. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Mol. Cell* 36(3): 469-476.
- Shapiro-Shelef M. and Calame K., 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5(3): 230-242.
- Shen H. M., Peters A., Baron B., Zhu X. and Storb U., 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280(5370):1750-1752.
- Sherr C. G., 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20(5): 187-190.
- Sherr C. J., 1993. Mammalian G₁ Cyclins. *Cell* 73: 1059-1065.
- Sherr C. J. and Roberts J. M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13(12): 1501-1512.
- Shi Y., Glynn J. M., Guilbert L. J., Cotter T. G., Bissonnette R. P. and Green D. R., 1992. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257(5067): 212-214.
- Si J., Yu X., Zhang Y. and DeWille J. W., 2010. Myc interacts with Max and Miz1 to repress C/EBPdelta promoter activity and gene expression. *Mol. Cancer* 9:92.
- Sluss H. K., Gannon H., Coles A. H., Shen Q., Eischen C. M. and Jones S. N., 2010. Phosphorylation of p53 serine 18 upregulates apoptosis to suppress Myc-induced tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* 8(2): 216-222.
- Smith M. R., Joshi I., Jin F. and Al-Saleem T., 2006. Murine model for mantle cell lymphoma. *Leukemia* 20(5): 891-893.
- Smith S. M., Anastasi J., Cohen K. S. and Godley L. A., 2010. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol. Dis.* 45(4): 317-323.
- Solomon D. A., Wang Y., Fox S. R., Lambeck T. C., Giesting S., Lan Z., Senderowicz A. M., Conti C. J. and Knudsen E. S., 2003. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 278(32): 30339-30347.
- Sotillo R., Dubus P., Martín J., de la Cueva E., Ortega S., Malumbres M. and Barbacid M., 2001. Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* 20(23): 6637-6647.
- Speidel D., 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20(1): 14-24.
- Spilianakis C. G., Lalioti M. D., Town T., Lee G. R. and Flavell R. A., 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435(7042): 637-45.

- St Clair S. and Manfredi J. J., 2006. The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 5(7): 709-713.
- Stall A. M., Adams S., Herzenberg L. A. and Kantor A. B., 1992. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651: 33-43.
- Stark G. R. and Taylor W. R., 2006. Control of the G2/M transition. *Mol. Biotechnol.* 32(3): 227-248.
- Stavnezer J., Guikema J. E. and Schrader C. E., 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 261-292.
- Stein G. H., Drullinger L. F., Soulard A. and Dulić V., 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 2109-2117.
- Stevens S., Ong J., Kim U., Eckhardt L. A. and Roeder R. G., 2000. Role of OCA-B in 3'-IgH enhancer function. *J. Immunol.* 164(10): 5306-5312.
- Storb U., Shen H. M., Michael N. and Kim N., 2001. Somatic hypermutation of immunoglobulin and non-immunoglobulin genes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356(1405): 13-19.
- Symonds H., Krall L., Remington L., Saenz-Robles M., Lowe S., Jacks T. and Van Dyke T., 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78(4): 703-711.

T

- Takai H., Smogorzewska A. and de Lange T., 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* 13(17): 1549-1556.
- Tang E. S. and Martin A., 2007. Immunoglobulin gene conversion: synthesizing antibody diversification and DNA repair. *DNA Repair (Amst.)* 6(11):1557-1571.
- Tangye S. G. and Tarlinton D. M., 2009. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 39(8): 2065-2075.
- Taub R., Moulding C., Battey J., Murphy W., Vasicek T., Lenoir G. M. and Leder P., 1984. Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells. *Cell* 36(2): 339-348.
- Taylor C. and Mai S., 1998. c-Myc-associated genomic instability of the dihydrofolate reductase locus *in vivo*. *Cancer Detect. Prev.* 22(4): 350-356.
- Taylor W. R. and Stark G. R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15): 1803-1815.
- Teng G. and Papavasiliou F. N., 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu. Rev. Genet.* 41: 107-120.
- Thompson A., Timmers E., Schuurman R. K. and Hendriks R. W., 1995. Immunoglobulin heavy chain germ-line J_H-C mu transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52. *Eur. J. Immunol.* 25(1): 257-261.

Références bibliographiques

Truffinet V., Pinaud E., Cogné N., Petit B., Guglielmi L., Cogné M and Denizot Y., 2007. 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(9): 6033-6042.

Tsai A. G., Lu H., Raghavan S. C., Muschen M., Hsieh C.-L. and Lieber M. R., 2008. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell* 135(6): 1130-1142.

Tsujimoto Y., Jaffe E., Cossman J., Nowell P. C. and Croce C. M., 1985. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 315(6017): 340-343.

Tsukada S., Sugiyama H., Oka Y. and Kishimoto S., 1990. Estimation of D segment usage in initial D to J_H joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5' D segment and DQ52, the most J_H-proximal D segment. *J. Immunol.* 144(10):4053-4059.

V

Van Dyke T., 2007. p53 and tumor suppression. *N. Engl. J. Med.* 356(1): 79-81.

Vanasse G. J., Halbrook J., Thomas S., Burgess A., Hoekstra M. F., Disteché C. M. and Willerford D. M., 1999. Genetic pathway to recurrent chromosome translocations in murine lymphoma involves V(D)J recombinase. *J. Clin. Invest.* 103(12): 1669-1675.

Varlakhanova N. V. and Knoepfler P. S., 2009. Acting locally and globally: Myc's ever-expanding roles on chromatin. *Cancer Res.* 69(19): 7487-7490.

Vaseva A. V. and Moll U. M., 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787(5): 414-420.

Ventura A., Kirsch D. G., McLaughlin M. E., Tuveson D. A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E. E., Weissleder R. and Jacks T., 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 445(7128): 661-665.

Vervoorts J., Lüscher-Firzlaff J. M., Rottmann S., Lilischkis R., Walsemann G., Dohmann K., Austen M. and Lüscher B., 2003. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep.* 4(5): 484-490.

Vettermann C. and Schlissel M. S., 2010. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* 237(1): 22-42.

Vincent-Fabert C., Fiancette R., Cogné M., Pinaud E. and Denizot Y., 2010a. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40(12): 3306-3311.

Vita M. and Henriksson M., 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16(4): 318-330.

Vitolo U., Ferreri A. J. and Montoto S., 2008. Follicular lymphomas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 66(3): 248-261.

von der Lehr N., Johansson S., Wu S., Bahram F., Castell A., Cetinkaya C., Hydbring P., Weidung I., Nakayama K., Nakayama K. I., Söderberg O., Kerppola T. K. and Larsson L. G., 2003. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol. Cell* 11(5): 1189-1200.

Vousden K. H., 2005. p53 and PUMA: A deadly duo. *Science* 309(5741): 1685-1686.

Vousden K. H. and Lu X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2(8): 594-604.

Vousden K. H. and Prives C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3): 413-431.

W

Wabl M. R. and Burrows P. D., 1984. Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in *cis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(8): 2452-2455.

Wang H. Feng J., Qi C. F., Li Z., Morse H. C. 3rd and Clarke S. H., 2007. Transitional B cells lose their ability to receptor edit but retain their potential for positive and negative selection. *J. Immunol.* 179(11): 7544-7552.

Wang J. and Boxer L. M., 2005. Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J. Biol. Chem.* 280(13):12766-12773.

Wang J. H., Alt F. W., Gostissa M., Datta A., Murphy M., Alimzhanov M. B., Coakley K. M., Rajewsky K., Manis J. P. and Yan C. T., 2008. Oncogenic transformation in the absence of Xrcc4 target peripheral B cells that have undergone editing and switching. *J. Exp. Med.* 205(13): 3079-3090.

Wang J. H., Gostissa M., Yan C. T., Golf P., Hickernell T., Hansen E., Difilippantonio S., Wesemann D. R., Zarrin A. A., Rajewsky K., Nussenzweig A. and Alt F. W., 2009. Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* 460(7252): 231-236.

Wang W. and El-Deiry W. S., 2008. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr. Opin. Oncol.* 20(1): 90-96.

Wanzel M., Herold S. and Eilers M., 2003. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol.* 13(3): 146-150.

Weill J.-C., Weller S. and Reynaud C.-A., 2009. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 267-285.

Weinstock D. M., Richardson C. A., Elliott B. and Jasin M., 2006. Modeling oncogenic translocations: Distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10): 1065-1074.

Wilda M., Bruch J., Harder L., Rawer D., Reiter A., Borkhardt A. and Woessmann W., 2004. Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* 18(3): 584-588.

Références bibliographiques

Wierstra I. and Alves J., 2008. The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv. Cancer Res.* 99: 113-333.

Wiman K. G., 2007. Restoration of wild-type p53 function in human tumors: strategies for efficient cancer therapy. *Adv. Cancer Res.* 97: 321-338.

Wölfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Wölfel C., Klehmann-Hieb E., De Plaen E., Hankeln T., Meyer zum Büschenfelde K. H. and Beach D., 1995. A p16^{INK4a}-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269(5228): 1281-1284.

Wu C.-H., van Riggelen J., Yetil A., Fan A. C., Bachireddy P. and Felsher D. W., 2007. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(32): 13028-13033.

Wuerffel R., Wang L., Grigera F., Manis J., Selsing E., Perlot T., Alt F. W., Cogne M., Pinaud E. and Kenter A. L., 2007. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27(5): 711-722.

X

Xiong Y., Connolly T., Futcher B. and Beach D., 1991. Human D-type cyclin. *Cell* 65(4): 691-699.

Xu D., Popov N., Hou M., Wang Q., Björkholm M., Gruber A., Menkel A. R., Henriksson M., 2001. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(7): 3826-3831.

Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R. A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C. and Lowe S. W., 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445(7128): 656-660.

Y

Yang W., Qi Q., Zhang H., Xu W., Chen Z., Wang L., Wang Y., Dong X., Jiao H. and Huo Z., 2010. p21 Waf1/Cip1 polymorphisms and risk of esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 17(5): 1453-1458.

Yano T., Sander C. A., Clark H. M., Dolezal M. V., Jaffe E. S. and Raffeld M., 1993. Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 8(10): 2741-2748.

Yin X. Y., Grove L., Datta N. S., Long M. W. and Prochownik E. V., 1999. C-myc overexpression and p53 loss cooperate to promote genomic instability. *Oncogene* 18(5): 1177-1184.

Z

Zachau H. G., 2004. Immunoglobulin κ genes of human and mouse. In Honjo T., Alt F. W. and Neuberger M., 2004.

Zaller D. M. and Eckhardt L. A., 1985. Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(15): 5088-5092.

Zandvoort A. and Timens W., 2002. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 130(1): 4-11.

Zha S., Boboila C. and Alt F. W., 2009. Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(8): 798-800.

Zhan Q., Antinore M. J., Wang X. W., Carrier F., Smith M. L., Harris C. C. and Fornace A. J. Jr., 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18(18): 2892-2900.

Zhang S., Ramsay E. S. and Mock B. A., 1998. Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16^{INK4a} and p19^{ARF}, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, *Pctr1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5): 2429-2434.

Zhuang D., Mannava S., Grachtchouk V., Tang W. H., Patil S., Wawrzyniak J. A., Berman A. E., Giordano T. J., Prochownik E. V., Soengas M. S. and Nikiforov M. A., 2008. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* 27(52): 6623-6634.

Zilfou J. T. and Lowe S. W., 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1(5):a001883.