

# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

**UMR CNRS 7276 – CRIBL**

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

## THESE

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Amandine DAVID**

Le 7 février 2014

Coopération de voies oncogéniques dans la lymphomagenèse B  
dépendante de MYC : rôle de NF- $\kappa$ B

Directeurs de thèse : Dr. Nathalie FAUMONT et Pr. Jean FEUILLARD

### JURY

#### Président

Mme Danielle TROUTAUD, Professeurs des Universités, Limoges

#### Rapporteurs

Mme Karen LEROY, Professeur des Universités, INSERM, Créteil

Mme Nadine VARIN-BLANK, Directeur de Recherche, INSERM, Bobigny

#### Examineurs

M. Fabrice AGOU, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

Mme Nathalie FAUMONT, MCF, Chaire CNRS, Limoges

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, Limoges

Mme Fabienne MEGGETTO, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse



# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

**UMR CNRS 7276 – CRIBL**

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

## THESE

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Amandine DAVID**

Le 7 février 2014

Coopération de voies oncogéniques dans la lymphomagenèse B  
dépendante de MYC : rôle de NF- $\kappa$ B

Directeurs de thèse : Dr. Nathalie FAUMONT et Pr. Jean FEUILLARD

### JURY

#### Président

Mme Danielle TROUTAUD, Professeurs des Universités, Limoges

#### Rapporteurs

Mme Karen LEROY, Professeur des Universités, INSERM, Créteil

Mme Nadine VARIN-BLANK, Directeur de Recherche, INSERM, Bobigny

#### Examineurs

M. Fabrice AGOU, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

Mme Nathalie FAUMONT, MCF, Chaire CNRS, Limoges

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, Limoges

Mme Fabienne MEGGETTO, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse



## RESUME

Lorsqu'il infecte les lymphocytes B, le virus d'Epstein-Barr (EBV) est en latence III correspondant à l'expression de l'ensemble des gènes viraux dont celui codant LMP1 qui active la voie NF- $\kappa$ B. L'EBV est associé à divers lymphomes dont le lymphome de Burkitt (LB). Le LB est un lymphome agressif caractérisé par la translocation et la surexpression du gène *c-myc*. Dans le LB, l'EBV exprime son programme de latence I sans expression de LMP1, ni activation de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B peut être toxique dans les cellules de LB. C-Myc est aussi surexprimé dans les Lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), parmi lesquelles le sous-type ABC (cellule B activée) présente une activation constitutive de NF- $\kappa$ B. Ces situations différentes dans deux lymphomes distincts soulèvent la question de la compatibilité et/ou de la coopération entre c-Myc et NF- $\kappa$ B. L'objectif du travail est de tester si NF- $\kappa$ B coopère avec c-Myc dans le LB et les ABC-DLBCL. Dans le LB, nos résultats montrent que c-Myc réprime, grâce au facteur CTCF, les protéines de la latence-III de l'EBV pour aboutir à la latence I caractéristique de ce lymphome. Bien qu'au long terme c-Myc inhibe LMP1 et donc NF- $\kappa$ B, nous montrons que la coexistence de la latence-III avec c-Myc augmente la prolifération, la survie et le métabolisme des lymphocytes B. NF- $\kappa$ B joue un rôle majeur dans cet effet coopératif. L'utilisation du modèle murin  $\lambda$ c-Myc confirme *in vivo* l'importance du signal NF- $\kappa$ B dans les étapes précoces du LB au travers de la stimulation du TLR9. Dans les ABC-DLBCL, nous montrons que l'activation continue du récepteur CD40, inducteur de NF- $\kappa$ B, en présence de la dérégulation de c-Myc est responsable *in vivo* de l'agressivité de ce lymphome. Bien que les histoires oncogéniques du LB et des ABC-DLBCL soient différentes, elles impliquent les mêmes voies oncogéniques (*i.e.* c-Myc et NF- $\kappa$ B via EBV, TLR9 ou CD40) et leur distinction tient probablement à la temporalité d'action de NF- $\kappa$ B : précoce et transitoire dans le LB et constitutif tout au long du processus transformant dans les ABC-DLBCL.

Mots-clés : c-Myc, NF- $\kappa$ B, lymphome de Burkitt, DLBCL, EBV, TLR9

## ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) immortalizes B cells thanks to the latency III program, which corresponds to expression of all viral genes including that coding for LMP1 which activates the NF- $\kappa$ B pathway. EBV is associated with several lymphomas including Burkitt lymphoma (BL). BL are aggressive lymphoma due to *c-myc* translocation and overexpression. In BL, EBV expresses the latency I program without expression of LMP1 protein and NF- $\kappa$ B activation. NF- $\kappa$ B could be toxic for BL cells. C-Myc is also overexpressed in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) and the ABC (activated B-cell like)-subtype of these lymphomas exhibits constitutive NF- $\kappa$ B activation. These distinct situations in distinct lymphoma raise the question of the compatibility and/or cooperation between c-Myc and NF- $\kappa$ B. The aim of this work is to test whether NF- $\kappa$ B could cooperate with c-Myc in BL and ABC-DLBCL. In BL, our results show that c-Myc represses, thanks to CTCF factor, EBV-latency III proteins leading to latency I expression. Although in a long term c-Myc inhibits LMP1 and thus NF- $\kappa$ B, we show that expression of both EBV-latency III program and c-Myc increase the proliferation, survival and metabolism of B lymphocytes at early times. NF- $\kappa$ B plays a major role in this cooperation. Usage of the  $\lambda$ c-Myc mouse model supports *in vivo* the importance of NF- $\kappa$ B signal in the early stages of BL through TLR9 stimulation. In ABC-DLBCL, we demonstrate that a continuous activation of CD40 receptor, an NF- $\kappa$ B activator, in presence of c-Myc deregulation is responsible for *in vivo* aggressiveness of this lymphoma. Although the oncogenic stories of BL and ABC-DLBCL are distinct, they involve the same oncogenic pathways (*i.e.* c-Myc and NF- $\kappa$ B via EBV, TLR9 or CD40) and their distinction is probably due to the temporality of action of NF- $\kappa$ B: early and transient in BL and constitutive throughout the transforming process in ABC-DLBCL.

Keywords: c-Myc, NF- $\kappa$ B, Burkitt lymphoma, DLBCL, EBV, TLR9



## Abréviations

### A

ABC : Activated B Cell like

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AID : Activation Induced cytidine Deaminase

AKT : AK Transforming

AP-1 : Activator Protein 1

APAF-1 : Apopototic Protease-Activating Factor 1

APE1 : Apurinic/aprimidic Endonuclease 1

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide-like

ARF1 : ADP Ribosylation Factor 1

ARN : Acide Ribonucléique

ATF : Activating Transcription Factor

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

### B

BAD : Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2 Associated Death Promotor

BAFF : B cell Activating Factor

BAG2 : Bcl-2 associated Athanogene 2

BALF : BamHI A Leftward reading Frame

BARF : BamHI A Rightward reading Frame

BART : BamHI A region's Rightward Transcripts

BAX : Bcl-2 Associated X protein

BCL : B cell lymphoma

BCR : B Cell Receptor

BE : Barrier Element

BER : Base Excision Repair

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

BLIMP1 : B lymphocyte induced maturation protein 1

BLNK : B cell linker protein

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

### C

C : region Constante de l'immunoglobuline

CARD11 : Caspase Recruitment Domain Family, Member 11

CBF1 : Centromere Binding Factor 1

CBM : CARMA1-BCL10-MALT1 Complex

CBP : CREB Binding Protein

CCL : C-C motif Ligand

CD : Cluster of Differentiation

CDK : Cycline Dependent Kinase

CDR : Complementarity Determining Region

C/EBP $\alpha$  : CCAAT/Enhancer Binding Protein

CFLAR : CASP8 and FADD-like Apopotosis Regulator

CFSE : Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

CG : centre germinatif

c-IAP : c-Inhibitors of Apopotosis Protein

CIN85 : c-Cbl Interacting Protein of 85kDa

CKS : Cyclin-dependent Kinase regulatory Subunit

CLP : Common Lymphoid Precursors

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

C-MYC : Cellular Myelocytomatosis

COX2 : Cyclo-Oxygénase 2

CTAR : Carboxy-Terminal Activation Region

CTCF : CCCTC-binding Factor

CUL-1 : Cullin 1

### D

dC : désoxy-Cytidine

dG : désoxy-Guanosine

dT : désoxy-Thymidine

dU : désoxy-Uridine

D : segment de Diversité

DAG : Diacylglycerol

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DHH : Desert hedgehog

DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma

DS : Dyad Symmetry

### E

E2A : E box binding protein 2A

E2F : E2 promotor binding Factor

EBF : Early B cell Factor

EBER : EBV-Encoded small nonpolyadenylated RNA

EBNA : EBV-Encoded Nuclear Antigens

EBV : Epstein-Barr Virus

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMSA : Electromobility Shift Assay

ERK : Extracellular Regulated Kinase

### F

FADD : Fas Associated Death Domain

FBP : Fuse Binding Protein

FDC : Follicular Dendritic Cell

FGF : Fibroblast Growth Factor

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FR : Family of Repeats

## G

Gadd45 : Growth arrest and DNA-damage inducible 45

GCB : Germinal Center B-cell like

GCN5 : General Control of amino-acid synthesis 5

gp : glycoprotéine

GSK-3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$

## H

H : Heavy

HHV : Human Herpes-Virus

HLH : Helix-Loop-Helix

HSP70 : Heat Shock Protein 70

## I

Ig : Immunoglobuline

IgH : locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines

ICAM-1 : IntraCellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interférons

IGF-1 : Insulin Growth Factor

I $\kappa$ B : Inhibitor of  $\kappa$ B

IKK : I $\kappa$ B Kinase

IL : Interleukine

IP3 : inositol triphosphate

IPI : International Prognostic Index

IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

IRF : Interferon Regulatory Factor

IRP1 : Iron Regulatory Protein 1

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

## J

J : segment de Jonction

JAK2 : Janus Kinase 2

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

## K

Kb : kilobase

kDa : kiloDaltons

## L

L : Light

LB : Lymphome de Burkitt

LCL : Lymphoblastoid Cell Line

LCR : Locus Region Control

LDH : Lactate Déshydrogénase

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMP : Latent Membrane Protein

LNH : Lymphome non-Hodgkinien

LPS : Lipopolysaccharide

LT $\beta$  : Lymphotoxine  $\beta$

LUBAC : Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex

## M

MALT1 : Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAR : Matrix Attachment Region

MAX : MYC Associated Factor X

MB : Myc Box

MDM2 : Murine double minute 2

MINE : c-Myc INSulator Element

MIZ1 : Myc Interacting Zinc finger protein 1

MMP : MétalloProtéinase Matricielle

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

## N

NEDD4 : Neural precursor cell-Expressed Developmentally Down-regulated gene 4

NEMO : NF- $\kappa$ B Essential Modulator

NFAT : Nuclear Factor of Activated T Cell

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor  $\kappa$ B

NFY : Nuclear transcription Factor Y

NGS : Nouvelle Génération de Séquençage

NHEJ : Non Homologous End Joining

NIK : NF- $\kappa$ B Inducing Kinase

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localisation Sequence

NOS : Not Otherwise Specified

NOX2 : NADPH Oxidase 2

## O

OCT4 : Octamer-binding Transcription factor 4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OriP : Origine de Réplication

OTU : Ovarian Tumor

## P

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

Pax5 : Paired-Box gene 5

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PE : Phycérythrine



PerCP : Peridinin Chlorophyll Protein Complex

PEST : domaine riche en Proline, Acide Glutamique, Serine et Thréonine

PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase

PIP3 : Phosphatidylinositol-3;4;5-triphosphate

PKC : Protéine Kinase C

PLL : ProLymphocytic Leukemia

PMBL : Primary Mediastinal B-cell Lymphoma

PP2A : Protein Phosphatase 2A

pRb : Protéine du Rétinoblastome

PRR : Pattern Recognition Receptors

P-TEF : Positive Transcription Elongation Factor

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTLD : Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder

PU1 : Purine box factor 1

PUMA : p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

## R

RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor - $\kappa$ B Ligand

RAG : Recombination Activating Gene

RBP-J $\kappa$  : Recombination-Binding Protein Jkappa

RHD : Rel Homology Domain

RIP : Receptor Interacting serine/thréonine Protein

RIPA : Radio ImmunoPrecipitation Assay

RPML : Roswell Park Memorial Institute medium

RSS : Recombination Signal Sequence

rtTA : reverse tetracycline-dependent Transactivator

## S

S : Switch

SCF<sup>Fbw7</sup> : Skp1-Cullin-1-F-box complex that contains FBW7

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SFK : Src Family Kinase

SHH : Sonic hedgehog

SKP2 : S-phase Kinase-associated Protein 2

SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling

SOX2 : SRY (sex determining region Y)-box 2

SP1 : Specific Protein 1

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SVF : Sérum de Veau Foetal

## T

TAD : Transcriptional Activation Domain

TAK1 : TGF- $\beta$  Activated Kinase 1

TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TFIIIB : Transcription Factor III B

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

TIP : TAT-Interactive Protein

TNF : Tumor Necrosis Factor

TLR : Toll Like Receptor

TR : Terminal Repeat

TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain

TRAF : TNFR-Associated Factor

TRAIL-R : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor

TRRAP : Transactivation/transcription domain Associated Protein

## U

UNG : Uracyle DNA Glycosylase

USP7 : Ubiquitin Specific-processing Protease 7

## V

V : segment de Variabilité/ région Variable de l'immunoglobuline

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## W

WHO : World Health Organization

## X

XBP1 : X-Box binding Protein 1

## Z

ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activator

ZnF : Zinc Finger



## Liste des figures et tableaux

### Introduction

Figure 1 : Représentation bidimensionnelle d'une immunoglobuline.....	6
Figure 2 : La signalisation du BCR.....	7
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobulines chez l'Homme.....	9
Figure 4 : Représentation schématique des réarrangements VDJ sur le locus des gènes des chaînes lourdes (IgH) permettant la formation d'une chaîne lourde $\mu$ . ....	9
Figure 5 : Représentation schématique du développement lymphocytaire B. ....	10
Figure 6 : Rôle de l'enzyme RAG. ....	11
Figure 7 : Le centre germinatif. ....	14
Figure 8 : Les voies de réparation impliquées dans le processus d'hypermutation somatique. ....	17
Figure 9 : Mécanisme de la commutation de classe. ....	18
Figure 10 : Stades terminaux de la différenciation lymphocytaire B et programmes transcriptionnels associés ....	20
Figure 11 : L'origine cellulaire des lymphomes B.....	22
Figure 12 : Les trois points critiques de cassure et de translocation au locus IgH.....	24
Figure 13 : Structure du virion de l'EBV en microscopie électronique. ....	32
Figure 14 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme d'épisome. ....	33
Figure 15 : Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction des différents types de latences virales.....	34
Figure 16 : Représentation schématique de la structure de la protéine EBNA1. ....	36
Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la protéine EBNA2. ....	38
Figure 18 : Structure et fonctions signalisatrices de la protéine LMP1.....	41
Figure 19 : Représentation schématique de la signalisation induite par LMP2A. ....	43
Figure 20 : Représentation de l'infection des lymphocytes B par l'EBV in vitro.....	45
Figure 21 : Modèle de l'infection persistante des lymphocytes B par l'EBV.....	48
Figure 22 : Mécanismes cellulaires contrôlés par MYC dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse. ....	51
Figure 23 : La structure du gène MYC. ....	52
Figure 24 : La structure de la protéine MYC.....	53
Figure 25 : L'activité MYC.....	55
Figure 26 : Le cycle cellulaire.....	59
Figure 27 : Interaction de MYC avec les voies de signalisation apoptotiques. ....	63

Figure 28 : Coupe histologique de lymphome de Burkitt. ....	68
Figure 29 : Localisation des points de cassure au niveau du gène MYC et sur le locus IgH lors du lymphome de Burkitt (LB). ....	69
Figure 30 : Courbe de survie globale des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) de la région Limousin selon l'IPI (International Pronostic Index) (période 2003-2010). (Penot, 2012). ....	78
Figure 31 : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). ....	81
Figure 32 : Représentation schématique des membres de la famille NF- $\kappa$ B. ....	87
Figure 33 : Représentation schématique des inhibiteurs de la famille I $\kappa$ B (Inhibitor of NF- $\kappa$ B). ....	88
Figure 34 : Voie d'activation classique NF- $\kappa$ B. ....	90
Figure 35 : Représentation schématique des sous-unités du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase). ....	91
Figure 36 : Voie d'activation alternative (non canonique) de NF- $\kappa$ B. ....	93
Tableau 1 : Translocations chromosomiques et mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la lymphomagenèse. ....	25
Tableau 2: Exemples de gènes cibles du facteur de transcription MYC et les fonctions cellulaires dans lesquels ils sont impliqués. ....	65
Tableau 3 : Différents variants et sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). .	79
Tableau 4 : Exemple de gènes cibles du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les fonctions cellulaires qu'ils modulent. ....	96

## Résultats

### Partie 1

Figure 1 : Description des modèles cellulaires EREB2-5 et P493-6. ....	105
--	-----

### Partie 2

Figure 1 : La croissance tumorale in vivo est Maximale en présence du programme de latence III de l'EBV plus MYC. ....	110
--	-----

Figure 2 : Analyse de l'expression des protéines MYC et LMP1 dans les cellules P493-6 avant xénogreffe et dans les tumeurs développées par les souris SCID. ....	112
--	-----

### Partie 3

Figure 1 : La signalisation du TLR9. ....	115
---	-----

Figure 2 : Le TLR9 à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative. ....	117
--	-----

Figure 3 : Effets de la stimulation du TLR9 in vivo chez des souris transgéniques $\lambda$ c-MYC pré-tumorales âgées de 6 semaines. ....	123
Figure 4 : Effets de la stimulation du TLR9 sur l'activation des cellules B et la prolifération des splénocytes totaux chez des souris transgéniques $\lambda$ c-MYC. ....	124
Figure 5 : Effets de la stimulation du TLR9 in vivo sur le pourcentage et le nombre absolu de lymphocytes B présents dans la rate de souris transgéniques $\lambda$ c-MYC. ....	125
Figure 6 : Histologie de la rate après stimulation in vivo du TLR9. ....	126
Figure 7 : Expériences de xéno greffe sur souris SCID réalisées pour étudier l'effet de la stimulation du TLR9 in vivo.....	128
Figure 8 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur la prolifération ex vivo des cellules $\lambda$ c-MYC. ....	129
Figure 9 : Expression du TLR9, MYC et TRAF-1 selon le stade du processus tumoral dépendant de MYC. ....	131
Figure 10 : Etude de la croissance tumorale in vivo par des expériences de xéno greffe sur souris SCID. ....	133
Figure 11 : Détermination du pourcentage de cellules B dans les tumeurs développées chez la souris SCID.....	134
Figure 12 : Expression de MYC et TRAF-1 dans les tumeurs SCID.....	135
Figure 13 : Rôle de la stimulation du TLR9 dans la pathogenèse associée au lymphome de Burkitt. ....	139

#### Partie 4

Figure 1 : Modèle murin conditionnel L.CD40 <sup>+/-</sup> + cre-CD19 <sup>+/-</sup> . ....	142
Figure 2 : Les souris « L.CD40 <sup>+/-</sup> + $\lambda$ c-MYC » développent rapidement des lymphomes agressifs au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate et du foie.....	144
Figure 3 : Histologie des tissus lymphoïdes de souris « L.CD40 <sup>+/-</sup> + $\lambda$ c-MYC » âgées de 12 semaines. ....	146
Figure 4 : La prolifération in vitro des splénocytes des souris « L.CD40 <sup>+/-</sup> + $\lambda$ c-MYC » est augmentée. ....	148
Figure 5 : Modèle murin conditionnel B « Tet.c-MYC + rtTa ».....	151



# Sommaire

<b>Avant-propos .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I Introduction bibliographique.....</b>	<b>4</b>
I. Eléments simplifiés de la transformation lymphocytaire B.....	5
1. Développement lymphocytaire B normal.....	5
1.1 Structure des immunoglobulines .....	5
1.2 Structure et signalisation du BCR.....	7
1.3 Les gènes codant les immunoglobulines.....	8
1.4 Différenciation lymphocytaire B médullaire : phase indépendante de l'antigène .....	10
1.4.1 Stade pré-pro B .....	10
1.4.2 Stade pro-B.....	11
1.4.3 Stade pré-B.....	12
1.4.4 Stade B immature .....	13
1.5 Différenciation lymphocytaire B en périphérie : phase dépendante de l'antigène, réponse T-dépendante.....	14
1.5.1 Hypermutation somatique.....	15
1.5.2 Commutation de classe ou isotypique .....	17
1.6 Stades terminaux de la différenciation lymphocytaire B T-dépendante .....	18
1.6.1 Les cellules B mémoires .....	18
1.6.2 Les plasmocytes .....	19
1.7 Différenciation lymphocytaire B en périphérie : réponse T-indépendante.....	20
2. Les grands mécanismes de transformation associés à la lymphomagenèse B.....	21
2.1 Origine cellulaire des lymphomes B .....	21
2.2 Mécanismes de la lymphomagenèse B .....	23
2.2.1 Evénements géniques transformants .....	23
2.2.2 Rôle de l'activation continue du BCR .....	26
2.2.3 Rôle du microenvironnement tumoral .....	28
2.2.4 Rôle de l'infection par un virus .....	29
II. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) .....	31
1. Taxonomie et épidémiologie .....	31
2. Biologie de l'EBV .....	32
3. Les antigènes nucléaires EBNA ( <i>Epstein-Barr Nuclear Antigen</i> ) .....	35

3.1	EBNA1.....	35
3.2	EBNA2.....	37
3.3	EBNA-LP ( <i>Leader Protein</i> ou EBNA-5).....	38
3.4	Les EBNA3 (-3A, -3B et -3C).....	39
4.	Les protéines de membranes LMP ( <i>Latent Membrane Protein</i> ).....	39
4.1	LMP1.....	39
4.2	LMP1/NF- $\kappa$ B et transformation cellulaire.....	41
4.3	LMP2A et LMP2B.....	42
5.	Les ARN non codants.....	44
5.1	Les ARN EBER.....	44
5.2	Les transcrits BART.....	44
6.	Physiologie de l'infection.....	45
6.1	L'infection par l'EBV <i>in vitro</i> .....	45
6.2	L'infection par l'EBV <i>in vivo</i> .....	46
7.	L'EBV et la lymphomagenèse B.....	48
III.	Le facteur de transcription MYC.....	51
1.	Structure du gène MYC.....	52
2.	Structure de la protéine MYC.....	52
3.	Activité de MYC.....	53
4.	Régulation de l'expression et de l'activité de MYC.....	55
5.	Fonctions des gènes cibles de MYC.....	58
5.1	Cycle cellulaire, croissance et prolifération.....	58
5.2	Métabolisme.....	60
5.3	Différenciation et pluripotentialité.....	61
5.4	Angiogenèse.....	61
5.5	Instabilité génomique.....	62
5.6	MicroARN induits par MYC.....	62
5.7	Apoptose.....	63
6.	Coopération entre MYC et d'autres voies transformantes.....	65
IV.	Le lymphome de Burkitt.....	67
1.	Présentation épidémiologique, histologique et immunophénotypique.....	67
2.	Profil génétique du lymphome de Burkitt.....	68
3.	Altérations géniques additionnelles.....	70
4.	Co-facteurs impliqués dans le lymphome de Burkitt.....	71
4.1	Rôle de l'EBV.....	71



4.2	Rôle de la stimulation et sélection antigénique <i>via</i> le BCR .....	73
4.3	Rôle de la malaria .....	74
4.4	Rôle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) .....	74
5.	Modélisation du lymphome de Burkitt chez la souris .....	75
V.	Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) .....	77
1.	Présentation générale.....	77
2.	Immunophénotype des DLBCL communs.....	80
3.	Groupes moléculaires des DLBCL communs.....	81
3.1	Le sous-groupe GCB « Germinal center B cell like » .....	81
3.2	Le sous-groupe ABC « Activated B-cell like » .....	82
4.	Les autres signatures de DLBCL .....	83
4.1	Signature stromale .....	83
4.2	Signature métabolique.....	83
5.	DLBCL et thérapeutique.....	84
VI.	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.....	86
1.	Les sous-unités NF- $\kappa$ B .....	86
2.	Les inhibiteurs I $\kappa$ B .....	87
3.	Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B .....	89
3.1	La voie d'activation classique (canonique).....	89
3.2	La voie d'activation alternative (non canonique).....	92
4.	A20, régulateur de la voie NF- $\kappa$ B .....	94
5.	Les fonctions biologiques de NF- $\kappa$ B et cancers.....	96
6.	Modèles murins d'activation NF- $\kappa$ B.....	98
7.	Altérations affectant les régulateurs de la voie NF- $\kappa$ B dans les ABC-DLBCL.....	99
	<b>Chapitre II Objectifs .....</b>	<b>101</b>
	<b>Chapitre III Résultats .....</b>	<b>103</b>
	<b>Partie 1 : Manuscrit en préparation .....</b>	<b>104</b>
	<b>Partie 2 : Résultats complémentaires .....</b>	<b>107</b>
I.	Matériels et méthodes .....	107
1.	Xénogreffes des cellules P493-6 aux souris SCID ( <i>severe combined immunodeficiency</i> ) ....	107
2.	Caractérisation des tumeurs développées chez les souris SCID .....	108
3.	Extraction et immunodétection des protéines par Western-blot .....	108

II.	Résultats .....	109
III.	Discussion, perspectives et conclusions .....	112
<b>Partie 3 : Résultats préliminaires.....</b>		<b>114</b>
I.	Introduction.....	114
1.	Présentation générale des Toll-like récepteurs ou TLR .....	114
2.	TLR9 : de la réponse innée vers la réponse adaptative .....	115
2.1	Signalisation du TLR9 : activation de NF- $\kappa$ B .....	115
2.2	Le TLR9 à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative .....	116
3.	TLR9 : une cible thérapeutique pour le traitement des lymphomes B ? .....	117
4.	TLR9 et lymphome de Burkitt .....	118
II.	Objectifs du travail.....	118
III.	Matériels et Méthodes .....	119
1.	Modèles murins .....	119
2.	Stimulation du TLR9 et prolifération <i>in vivo</i> .....	119
3.	Histologie de la rate de souris sauvage ou Ig $\lambda$ -MYC après stimulation du TLR9 .....	120
4.	Isolement des cellules murines et immunomarquages .....	120
5.	Stimulation cellulaire par des motifs CpG et étude de la prolifération <i>ex vivo</i> .....	120
6.	Xénogreffes aux souris SCID.....	121
7.	Immunodétection des protéines par Western-blot.....	121
IV.	Résultats .....	121
1.	Effets de l'injection <i>in vivo</i> de motifs CpG chez des souris transgéniques $\lambda$ c-MYC .....	121
2.	Effets de la stimulation du TLR9 sur le développement tumoral dans un contexte d'immunodépression .....	127
2.1	Effet de la stimulation du TLR9 sur la prolifération cellulaire <i>ex vivo</i> .....	128
2.2	Expression du TLR9 et activation de NF- $\kappa$ B selon le stade du processus tumoral dépendant de MYC .....	130
2.3	Etude du rôle de la stimulation du TLR9 sur le développement tumoral <i>in vivo</i> .....	132
V.	Discussion et perspectives.....	136
VI.	Conclusions.....	138
<b>Partie 4 : Résultats préliminaires.....</b>		<b>140</b>
I.	Introduction.....	140
II.	Objectif du projet .....	141
III.	Matériels et méthodes .....	142
1.	Modèles murins .....	142

2.	Analyse histologique et l'isolement des cellules pour leur immunophénotypage et l'étude de la prolifération et de la survie .....	143
IV.	Résultats .....	143
1.	Les souris « L.CD40 <sup>+/-</sup> + λc-MYC » développent des lymphomes agressifs localisés dans la rate, les ganglions lymphatiques et le foie.....	143
2.	Analyse histologique des tumeurs « L.CD40 <sup>+/-</sup> + λc-MYC ».....	145
3.	La prolifération <i>ex vivo</i> des splénocytes des souris « L.CD40 <sup>+/-</sup> + λc-MYC » est augmentée	146
V.	Discussion et perspectives.....	149
VI.	Conclusion .....	152
	<b>Chapitre IV Discussion Générale et Conclusion .....</b>	<b>153</b>
I.	Discussion générale et perspectives.....	154
II.	Conclusions.....	161
	<b>Chapitre V Annexes.....</b>	<b>162</b>
	<b>Chapitre VI Références Bibliographiques .....</b>	<b>165</b>



# **Avant-propos**



L'apparition de tumeurs ou tumorigenèse est un processus multi-étapes reflétant des altérations génétiques d'une cellule normale aboutissant à sa transformation progressive en cellule maligne.

Environ les trois quarts des tumeurs malignes humaines présentent une dérégulation de l'expression ou de l'activité de l'oncogène *MYC*, pouvant résulter de translocations chromosomiques, d'amplifications géniques ou encore de mutations. *MYC* est un régulateur transcriptionnel maître de la prolifération cellulaire. Cependant sa surexpression est aussi capable d'induire l'apoptose. *MYC* apparaît donc comme un oncogène ambivalent et l'émergence des tumeurs qui lui sont associées nécessitent la coopération d'autres voies oncogéniques.

Parmi les cancers hématopoïétiques, ceux des lymphocytes B (lymphomes B) représentent plus de 80%. Nous nous intéresserons dans ce manuscrit à deux lymphomes B à évolution clinique rapide dits agressifs. D'une part, le lymphome de Burkitt (LB) dont l'événement oncogénique primaire est la translocation du gène *MYC* dans un des loci des chaînes d'immunoglobuline. D'autre part, les lymphomes B diffus à grandes cellules de type immunoblastique ou activé (ABC-DLBCL) pour lesquels la dérégulation de la voie oncogénique NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) joue un rôle majeur dans le processus transformant. Le travail présenté s'intéresse à l'histoire oncogénique de ces deux lymphomes agressifs qui bien que très différents semblent impliquer les mêmes voies oncogéniques, NF- $\kappa$ B et *MYC*. Nous verrons que leur distinction tient très probablement à la temporalité d'action de NF- $\kappa$ B : précoce et transitoire dans le LB et constitutif tout au long du processus transformant dans les ABC-DLBCL.

Dans une première partie bibliographique, nous décrirons les étapes du développement lymphocytaire B normal, et les grands mécanismes à l'origine des lymphoproliférations B. Parmi ces mécanismes de transformation, nous porterons une attention particulière au virus d'Epstein-Barr (EBV) fréquemment associé au LB. Nous continuerons par une description du LB et du facteur de transcription *MYC*. Enfin, ce chapitre bibliographique sera terminé par une description des DLBCL et de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. La deuxième partie présentera les résultats expérimentaux obtenus lors de mes travaux de thèse. Un premier volet sera consacré au rôle de la voie NF- $\kappa$ B, induite par l'EBV, dans la genèse du LB. Nous présenterons également des résultats préliminaires sur l'étude du rôle d'un récepteur de l'immunité innée, le TLR9 (*Toll-like receptor 9*), dans la lymphomagenèse associée au LB. Un deuxième volet concernera l'établissement d'un modèle murin des DLBCL-ABC qui montre l'impact de l'expression conjointe

et continue des facteurs oncogéniques NF- $\kappa$ B *via* le récepteur CD40, et MYC. Ce manuscrit se terminera par une discussion générale des résultats au regard de la littérature ainsi que par une conclusion et des perspectives inhérentes à ces travaux.



# **Chapitre I**

## **Introduction bibliographique**



## **I. Eléments simplifiés de la transformation lymphocytaire B**

Cette première partie de l'introduction bibliographique est d'abord consacrée au développement normal du lymphocyte B en décrivant succinctement les différents événements géniques qui le caractérisent et à l'origine de la diversification du répertoire antigénique. Puis nous évoquerons les principaux mécanismes de transformation impliqués dans la lymphomagenèse B.

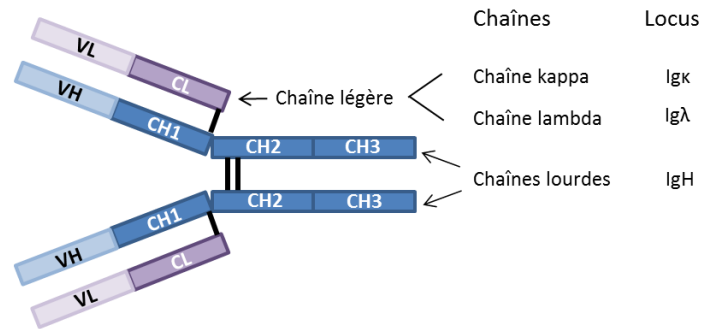
### **1. Développement lymphocytaire B normal**

Le développement des lymphocytes B, à partir des cellules souches hématopoïétiques, commence dans les organes lymphoïdes primaires tels que le foie fœtal *in utero* puis la moelle osseuse après la naissance, indépendamment de la rencontre avec l'antigène. Cette phase génère des millions de lymphocytes B différents, porteurs chacun d'un récepteur B [BCR (*B Cell Receptor*) ou immunoglobuline membranaire] unique.

Après stimulation antigénique d'un lymphocyte B *via* son BCR, sa maturation se continue dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. C'est la phase dépendante de l'antigène. Les stades terminaux de différenciation lymphocytaire B sont représentés par les lymphocytes B mémoires capables de répondre rapidement à des pathogènes lors d'une réponse secondaire et les plasmocytes spécialisés dans la production et la sécrétion d'immunoglobulines solubles ou anticorps.

#### **1.1 Structure des immunoglobulines**

La structure des immunoglobulines (Ig) repose sur l'assemblage de deux chaînes lourdes (H pour *Heavy*) identiques entre elles et de deux chaînes légères (L pour *Light*), également identiques entre elles (Figure 1).



**Figure 1 : Représentation bidimensionnelle d'une immunoglobuline.**

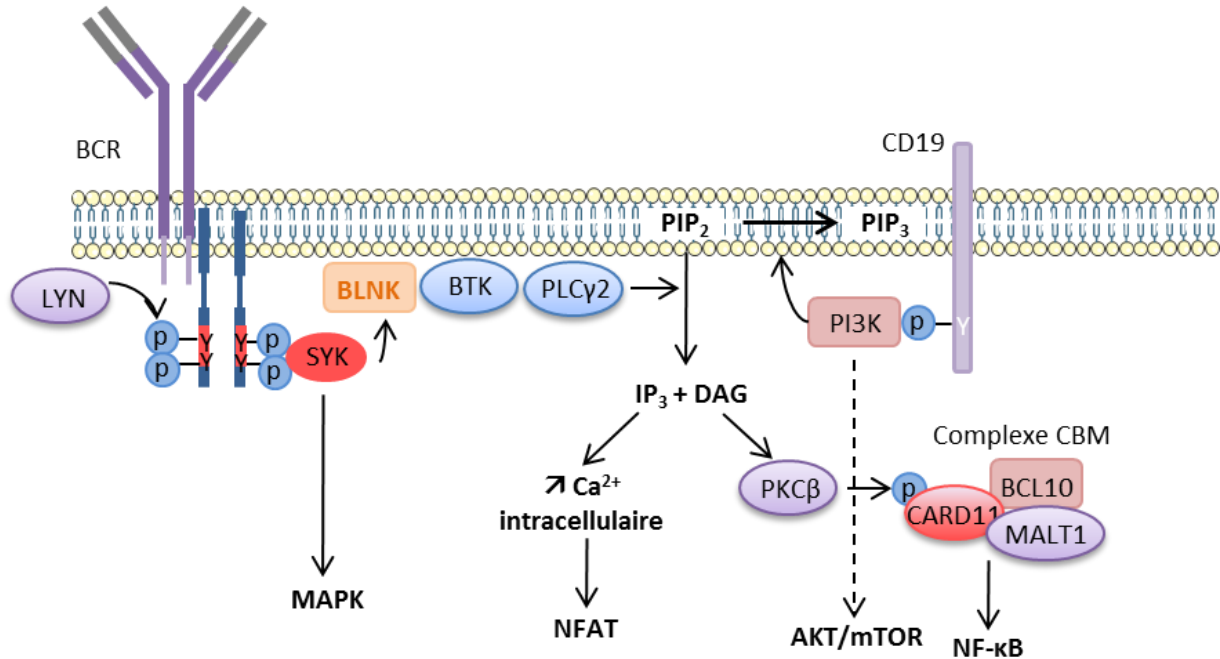
VH et VL représentent les régions variables des chaînes lourdes et légères. CH et CL représentent les régions constantes des chaînes lourdes et légères. Les traits noirs épais représentent les ponts disulfures. Chaque molécule d'anticorps consiste en deux chaînes légères identiques et en deux chaînes lourdes également identiques. Les quatre chaînes d'une molécule d'anticorps sont maintenues entre elles par des ponts disulfures.

Les chaînes lourdes sont liées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxy-terminale. Le tétramère ainsi obtenu correspond à une protéine d'environ 150kDa (Edelman, 1970). Chaque chaîne est constituée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le paratope ou site de fixation à l'antigène. Cette région est constituée de trois domaines hypervariables appelés CDR (*Complementarity Determining Region*). Les domaines constants des chaînes lourdes confèrent les propriétés effectrices de l'immunoglobuline. Les deux types de chaînes légères,  $\kappa$  et  $\lambda$ , peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$  et  $\gamma$ , donnant respectivement les IgM, IgD, IgE, IgA et IgG. L'IgM est la première classe d'anticorps à être sécrétée durant la réponse primaire à l'antigène. L'IgD est impliquée dans la réponse antibactérienne, l'IgA intervient dans la protection des muqueuses, il s'agit de la classe majeure retrouvée dans les sécrétions externes. L'IgE permet les défenses anti-parasitaires mais possède aussi un rôle dans les phénomènes d'hypersensibilité. L'IgG est la classe d'anticorps la plus abondante dans le plasma sanguin. Quatre sous-classes d'IgG sont décrites chez l'Homme : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les IgG interviennent dans la neutralisation des toxines, des bactéries et des virus.

Les immunoglobulines exprimées à la surface des cellules B constituent le récepteur membranaire ou BCR qui permet la reconnaissance de l'antigène.

## 1.2 Structure et signalisation du BCR

La liaison du BCR avec l'antigène transmet des signaux intracellulaires de prolifération et de survie (Figure 2).



**Figure 2 : La signalisation du BCR.**

Après la liaison à l'antigène, la cellule B transmet des signaux via le BCR (B Cell Receptor) à l'intérieur de la cellule. Les tyrosines des motifs ITAM des molécules CD79A et CD79B sont phosphorylées par des kinases de la famille SRC incluant LYN, FYN et BLK conduisant à la phosphorylation et l'activation de la tyrosine kinase SYK. SYK recrute BLNK (B cell linker protein), responsable de l'activation de BTK (Bruton Tyrosine Kinase) et de la phospholipase  $\gamma 2$ . Cette dernière catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate en diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate ( $IP_3$ ), conduisant à une augmentation des taux de calcium intracellulaire et à l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui va à son tour phosphoryler de nombreux substrats dont CARD11 (Caspase Recruitment Domain 11). En parallèle, la molécule transmembranaire CD19 est phosphorylée par la kinase LYN permettant la génération de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ( $PIP_3$ ) à partir de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. La signalisation induite par le BCR résulte en l'activation de facteurs impliqués dans l'activation cellulaire tels que NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cell), NF- $\kappa B$  (Nuclear Factor  $\kappa B$ ), ERK (Extracellular Regulated Kinase), AKT (AK Transforming). (inspiré d'après Young and Staudt, 2013). complexe CBM : Carma1-BCL10-Malt1 complex ; MALT1: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1

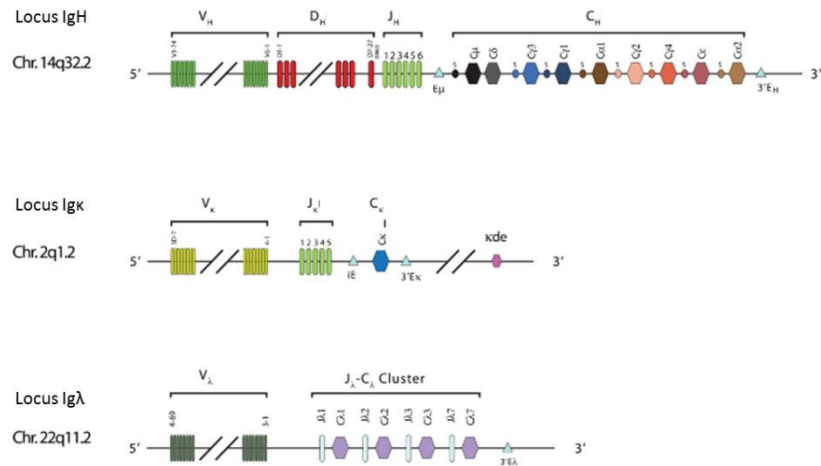
Le BCR est associé aux molécules CD79A ( $Ig\alpha$ ) et CD79B ( $Ig\beta$ ) qui possèdent des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation motif*) dans leur portion intra-cytoplasmique. Ces motifs ITAM contiennent deux résidus tyrosines (Reth, 1989). La liaison de l'antigène permet l'agrégation du BCR et sa translocation dans les microdomaines lipidiques ce qui déclenche la phosphorylation des deux résidus tyrosines par des kinases de la famille SRC incluant LYN, FYN et BLK.

Les motifs ITAM phosphorylés recrutent alors la tyrosine kinase SYK provoquant sa phosphorylation et activation (Rowley *et al.*, 1995). SYK activée recrute alors BLNK (*B Cell Linker protein*), responsable de l'activation de BTK (*Bruton Tyrosine Kinase*) et de la phospholipase  $\text{C}\alpha_2$ . Cette dernière catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3), conduisant à une augmentation des taux de calcium intracellulaire et à l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui va à son tour phosphoryler de nombreux substrats dont CARD11 (*Caspase Recruitment Domain Family, Member 11*). En parallèle, la molécule transmembranaire CD19 est phosphorylée par la kinase LYN permettant la génération de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. La signalisation induite par le BCR résulte en l'activation de facteurs impliqués dans l'activation cellulaire tels que NFAT, NF- $\kappa$ B, ERK, et AKT (pour revue : Young and Staudt, 2013).

### 1.3 Les gènes codant les immunoglobulines

Les gènes codant les immunoglobulines sont répartis en trois complexes différents (Schroeder and Cavacini, 2010) : le locus Igk sur le chromosome 2 et le locus Ig $\lambda$  sur le chromosome 22 codant les chaînes légères et le locus IgH sur le chromosome 14 codant la chaîne lourde (Figure 3).

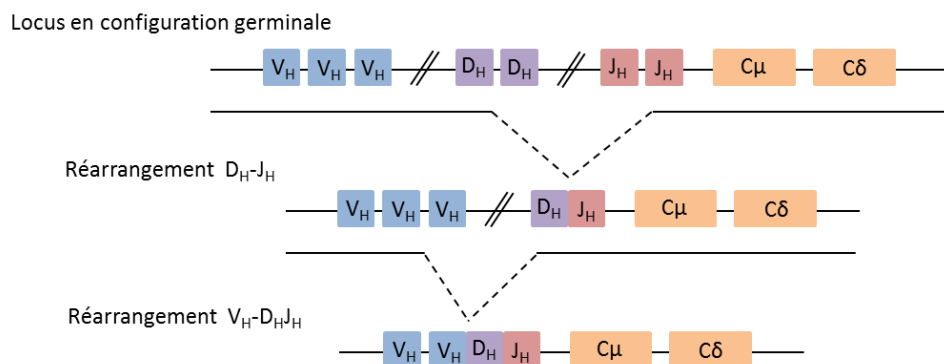
Chez l'Homme, le locus IgH regroupe 123 à 129 segments variables V, 27 segments de diversité D, 7 segments de jonction J et 11 segments constants C. Les loci Igk et Ig $\lambda$  ne possèdent pas de segment D et ont un nombre plus restreint de segments V et J : au locus Igk, 76 V<sub>k</sub>, 5 J<sub>k</sub> et 1 C<sub>k</sub> ; et au locus Ig $\lambda$ , 73-74 V $\lambda$  et 4-5 tandems J $\lambda$ -C $\lambda$ .



**Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des loci des gènes d'immunoglobulines chez l'Homme.**

Le locus IgH est localisé sur le chromosome 14 tandis que les loci Igk et Igλ sont situés sur les chromosomes 2 et 22 respectivement. Les segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) ainsi que les régions constantes sont représentés. Les segments D sont absents des loci Igk et Igλ. (modifié d'après Schroeder and Cavacini, 2010).

Lors des premières étapes du développement B dans la moelle osseuse (cf. paragraphe 1.4), les gènes codant les chaînes d'immunoglobulines subissent des réarrangements selon un ordre précis et séquentiel (Alt *et al.*, 1984) : d'abord dans le locus IgH (Figure 4), puis au niveau du locus Igk ou Igλ. Ces réarrangements juxtaposent un segment V, un segment J et un segment D (pour le locus IgH). Les réarrangements aléatoires V(D)J aboutissent à la production de gènes d'immunoglobulines fonctionnels et constituent le premier processus de génération de la diversité du BCR.



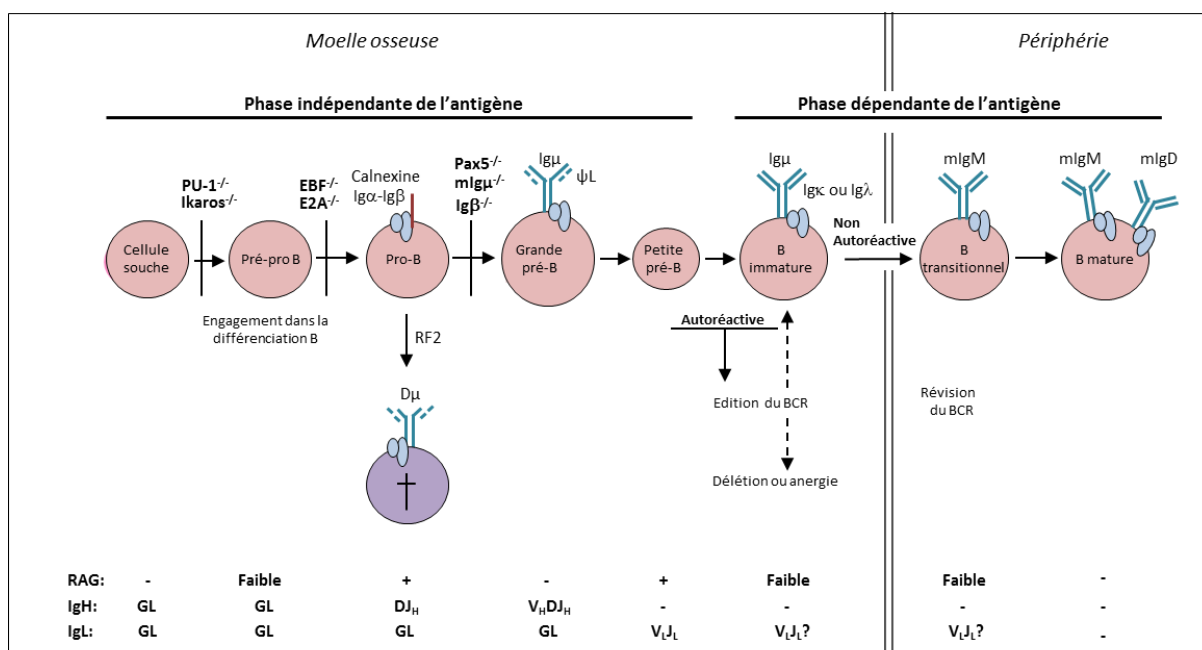
**Figure 4 : Représentation schématique des réarrangements VDJ sur le locus des gènes des chaînes lourdes (IgH) permettant la formation d'une chaîne lourde μ.**

Le locus IgH est d'abord représenté en configuration germinale. Au stade pro-B se produit un réarrangement D-J, puis le réarrangement V-DJ. Les segments V sont représentés en bleu, les segments D en violet, les segments J en rose et les segments constants en orange.

## 1.4 Différenciation lymphocytaire B médullaire : phase indépendante de l'antigène

### 1.4.1 Stade pré-pro B

Au cours de la différenciation lymphocytaire, une partie des cellules souches hématopoïétiques devient des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP pour *Common Lymphoid Precursors*) ou pré-pro B sous l'action des facteurs de transcription IKAROS et PU1 (*Purine box factor 1*) (Barneda-Zahonero *et al.*, 2012). Puis, les facteurs E2A (*E box binding protein 2A*) et EBF (*Early B cell Factor*) permettent l'expression du facteur PAX5 (*Paired-Box gene 5*) essentiel à l'engagement du CLP dans le lignage B (Figure 5).



**Figure 5 : Représentation schématique du développement lymphocytaire B.**

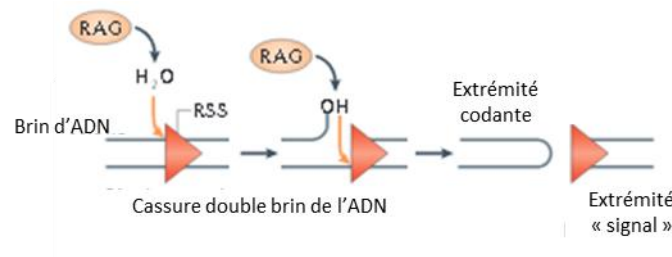
L'expression de RAG et le statut de réarrangement des loci des chaînes lourdes (IgH) et légères (IgL) sont indiqués ainsi que les différents facteurs de transcription impliqués dans l'ontogénèse B. Les réarrangements V(D)J ont lieu dans la moelle osseuse indépendamment de la rencontre avec l'antigène conduisant à l'expression d'un pré-BCR puis d'un BCR fonctionnel. Les lymphocytes B immatures exprimant un BCR fonctionnel et non autoréactif migrent en périphérie où se déroulera la rencontre avec l'antigène. (modifié d'après Meffre *et al.*, 2000).

GL: locus en configuration germinale ; Ig : immunoglobuline

PAX5 permet le maintien des progéniteurs dans le lignage B jusqu'au stade plasmablaste en réprimant des gènes nécessaires au développement d'autres lignages lymphocytaires (NK pour *Natural Killer* et lymphocytes T) et en activant des gènes essentiels pour le lignage B tels que le marqueur CD19 ou encore les gènes *RAG* (*Recombination Activating Gene*) responsables du réarrangement des gènes d'immunoglobulines (Cobaleda *et al.*, 2007) (Figure 6). Au stade



CLP, l'expression de *PAX5* et par conséquent celle des gènes *RAG-1* et *RAG-2* sont faibles. Ainsi les gènes des immunoglobulines ne sont pas encore réarrangés, on parle de loci en configuration germinale.



**Figure 6 : Rôle de l'enzyme RAG.**

L'enzyme RAG (Recombination Activating Gene) est formée par l'association de *RAG1* et *RAG2*. La recombinase RAG génère d'abord une cassure simple brin de l'ADN à proximité de la séquence signal de recombinaison (RSS pour Recombination Signal Sequence) en catalysant l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester. Cette réaction libère un groupement 3'hydroxyle (OH) qui va attaquer le deuxième brin d'ADN. Ceci conduit à la formation d'extrémités dites « codantes » en épingles à cheveux et d'extrémités « signal » à bouts francs. (modifié d'après Schatz and Ji, 2011).

Les CLP expriment les marqueurs CD45R (faiblement exprimé), CD43, CD34, CD10, c-kit/CD117 (récepteur du *Stem Cell Factor* ou SCF) et le récepteur à l'IL-7 (CD127) (LeBien, 2000). Les cellules stromales de la moelle osseuse permettent la survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques *via* la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-7. En présence d'IL-7, le CLP se différencie en cellule pro-B. Des souris déficientes en IL-7 ou en sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 présentent un blocage des cellules au stade CLP (Kikuchi *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Stade pro-B

La cellule pro-B exprime fortement le facteur *PAX5* ainsi que la molécule de surface CD19 dont le gène est la cible de *PAX5* (LeBien, 2000 ; Kozmik *et al.*, 1992). Ces cellules expriment plus fortement le CD45R et également la molécule CD79A en intracytoplasmique, les enzymes *RAG1* et *RAG2* en intranucléaire, et la TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) qui permet l'ajout de nucléotides de manière aléatoire aux extrémités des régions codantes à l'origine de la diversité jonctionnelle du BCR (pour revue: Samitas *et al.*, 2010).

C'est à ce stade qu'ont lieu les premiers réarrangements VDJ, au niveau du locus IgH, avec le rapprochement entre un segment  $D_H$  et un segment  $J_H$  sur les deux allèles (Figure 4). Puis s'effectue le rapprochement d'un segment  $V_H$  du segment  $D_HJ_H$  déjà réarrangé (Alt *et al.*, 1984). Le réarrangement  $V_H-D_HJ_H$  ne peut être productif que sur un seul allèle : c'est le phénomène d'exclusion allélique qui permet de bloquer les réarrangements lorsque ceux-ci sont fonctionnels sur un allèle (Corcoran, 2005 ; Jung *et al.*, 2006 ; Vettermann and Schlissel, 2010). Ce mécanisme est crucial puisqu'il permet à la cellule B de n'exprimer qu'un seul type de BCR à sa surface. En 2007, des travaux ont montré que les deux allèles (productifs et non-productifs) sont transcrits tout au long de développement B (Daly *et al.*, 2007). Les transcrits issus des réarrangements non-productifs sont pris en charge par les mécanismes de surveillance des ARN aboutissant à leur dégradation afin d'inhiber la synthèse d'une chaîne lourde tronquée potentiellement délétère pour la cellule (Tinguely *et al.*, 2012).

Le réarrangement VDJ au locus IgH est nécessaire à la différenciation de la cellule pro-B en cellule pré-B. Ainsi les cellules pro-B qui n'ont pas réarrangé leurs segments VDJ de manière fonctionnelle sur l'un ou l'autre allèle seront éliminées (LeBien, 2000).

#### 1.4.3 Stade pré-B

La différenciation de la cellule pro-B en cellule pré-B se caractérise par la perte d'expression des marqueurs CD34 et TdT. Plus de 95% des cellules pré-B expriment une chaîne lourde  $\mu$  fonctionnelle. Cette dernière s'associe à une pseudo chaîne légère (formée par l'association non covalente des protéines  $V_{\text{préB}}$  et  $\lambda 5$ ) et aux protéines transmembranaires CD79A/CD79B ( $Ig\alpha/Ig\beta$ ) pour former le récepteur de la cellule pré-B : le pré-BCR (Karasuyama *et al.*, 1996). Généralement les cellules pré-B sont divisées en deux sous-populations : les grandes cellules pré-B ou cellules pré-BI proliférantes et les petites cellules pré-B ou cellules pré-BII post-mitotiques (LeBien, 2000).

Dans les grandes cellules pré-B, le pré-BCR joue un rôle critique dans l'exclusion allélique en entraînant une diminution de l'expression des gènes *RAG* ayant pour conséquence l'inhibition des réarrangements sur le deuxième allèle du locus IgH.

Au sein des petites cellules pré-B, les gènes *RAG* sont réexprimés permettant le réarrangement aux loci des chaînes légères sans pour autant entraîner de nouveaux

réarrangements au locus des chaînes lourdes puisque celui-ci n'est plus accessible. Les réarrangements des gènes des chaînes légères débutent au locus Igk. Si aucun réarrangement fonctionnel sur les deux allèles ne s'est produit, ils se poursuivent au locus Igλ.

#### 1.4.4 Stade B immature

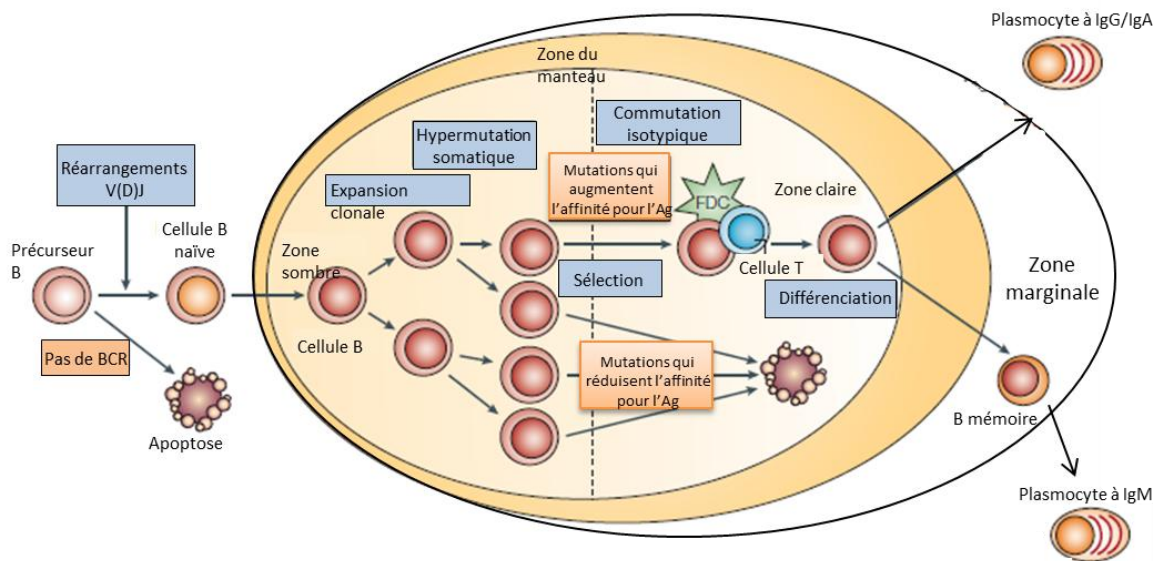
Ce stade B immature est caractérisé par la production d'une chaîne légère définitive, remplaçant alors la pseudo-chaîne légère, et pouvant s'associer avec la chaîne lourde pour former alors un BCR de type IgM qui confère à la cellule sa spécificité de reconnaissance de l'antigène.

Les lymphocytes B immatures subissent un processus de sélection négative au cours duquel les cellules possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées. Plusieurs mécanismes d'élimination des lymphocytes auto-réactifs sont décrits : l'anergie (*i.e.* inactivation de la cellule qui ne répond plus), la délétion clonale (*i.e.* élimination de la cellule auto-réactive par apoptose), l'ignorance clonale (*i.e.* antigène peu ou pas présent dans la moelle osseuse) et la correction du récepteur ou « *receptor editing* » (Manjarrez-Orduño *et al.*, 2009). Ce dernier processus permet de créer une nouvelle chaîne légère grâce à un réarrangement secondaire des régions variables des chaînes légères, modifiant ainsi la spécificité antigénique de l'immunoglobuline résultante (Edry and Melamed, 2004). Une cellule qui conserve son auto-réactivité malgré le « *receptor editing* » peut encore entrer en anergie ou en apoptose. La mise en place de ces mécanismes d'élimination des clones auto-réactifs dépend du degré d'affinité entre le BCR auto-réactif et l'auto-antigène (pour revue: Samitas *et al.*, 2010).

Les lymphocytes B immatures (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>) non auto-réactifs survivent et quittent la moelle osseuse en direction des organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques pour y subir les prochaines étapes de la maturation.

### 1.5 Différenciation lymphocytaire B en périphérie : phase dépendante de l'antigène, réponse T-dépendante

Les cellules B immatures ayant quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, le stade B transitionnel qui constitue la dernière étape avant la rencontre avec des antigènes exogènes. Ces cellules se différencient des cellules B immatures par leur expression membranaire de l'IgD. Les lymphocytes B matures naïfs (IgM+/IgD+) ont une demi-vie de trois jours. Lorsque la rencontre avec l'antigène se produit et que la cellule B reçoit des signaux complémentaires provenant de lymphocytes T auxiliaires (Th, *helper*) CD4 positifs (activation T-dépendante), elle va proliférer intensément et initier la formation de structures particulières appelées centres germinatifs au sein des organes lymphoïdes secondaires (Figure 7) (pour revues : Allen *et al.*, 2007 ; Klein and Dalla-Favera, 2008).



**Figure 7 : Le centre germinatif.**

Les cellules B matures activées par l'antigène deviennent des centroblastes qui subissent une expansion clonale dans la zone sombre du centre germinatif. Durant cette phase de prolifération, se déroule le processus d'hypermutation somatique qui introduit des mutations dans les régions V(D)J. Puis les centroblastes se différencient en centrocytes qui migrent vers la zone claire où les cellules seront sélectionnées pour leur capacité à lier l'antigène. Seules les cellules exprimant un récepteur de haute affinité pour l'antigène exposé sous forme de complexe immun par la cellule folliculaire dendritique et les cellules Th sont sélectionnées; elles subissent la commutation de classe et se différencient en cellule B mémoire ou en plasmocyte. Si les mutations diminuent l'affinité du BCR pour l'antigène, les cellules sont alors éliminées par apoptose. (modifié d'après Küppers, 2005).

Ag: antigène ; FDC: cellules folliculaires dendritiques; Ig: Immunoglobuline

Les centres germinatifs apparaissent au niveau des organes lymphoïdes secondaires quelques jours après l'exposition à l'antigène et persistent jusqu'à quelques semaines. Ils sont

formés de deux zones principales : la zone sombre constituée de cellules B en prolifération appelées centroblastes et la zone claire constituée de petites cellules B qui ne se divisent plus ou centrocytes. Ces lymphocytes B sont enchevêtrés dans un réseau de cellules folliculaires dendritiques présentatrices d'antigènes, de cellules T auxiliaires CD4 folliculaires et de macrophages. Les centroblastes expriment les marqueurs CD10, CD38 et CD77 ainsi que le facteur de transcription BCL6 (*B Cell Lymphoma 6*). Au plan génétique, les centroblastes sont soumis à deux événements majeurs, l'un obligatoire, le processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes des immunoglobulines (*cf.* paragraphe 1.5.1), et l'autre facultatif, la commutation de classe ou isotypique (*cf.* paragraphe 1.5.2). Durant cette phase, l'immunoglobuline de surface est peu ou pas exprimée. Le processus d'hypermutation somatique altère très significativement et de façon aléatoire l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène contre lequel elle a été sélectionnée, ce qui génère un nouveau répertoire de grande diversité.

Le centroblaste se différencie en centrocyte ( $CD10^+$ ,  $CD38^+$ ,  $BCL6^+$  et  $CD77^{\text{faible}}$ ) à la frontière de la zone sombre et de la zone claire, réexprimant alors une immunoglobuline de surface à taux élevé. Seules les cellules B exprimant un récepteur de haute affinité pour l'antigène exposé à l'état natif sous forme de complexe immun par les cellules folliculaires dendritiques sont sélectionnées. En revanche, si les mutations somatiques ne modifient pas, voire diminuent l'affinité du BCR pour l'antigène, les cellules sont alors éliminées par apoptose et sont épurées par les macrophages présents dans le centre germinatif.

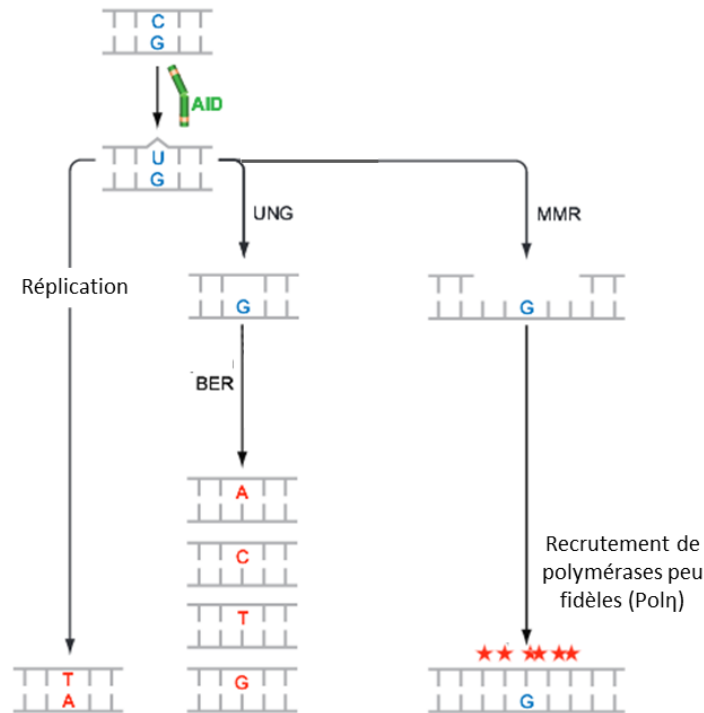
La différenciation du centrocyte nécessite son interaction avec le lymphocyte T auxiliaire CD4 folliculaire : interaction du récepteur CD40 avec son ligand (sur le lymphocyte T). Le centrocyte termine alors sa maturation en se différenciant en plasmocyte à longue durée de vie, effecteur de l'immunité humorale (Fairfax *et al.*, 2008), ou en lymphocyte B mémoire à longue durée de vie (Tangye and Tarlinton, 2009).

### 1.5.1 Hypermutation somatique

L'hypermutation somatique permet l'accumulation de mutations au niveau des gènes des régions variables des chaînes lourdes et légères modifiant ainsi leur affinité pour l'antigène. Ces mutations sont le plus souvent localisées au niveau de régions hypervariables CDR qui forment le site de fixation à l'antigène (pour revue : Di Noia and Neuberger, 2007). D'un point de

vue mécanistique, le processus d'hypermutation somatique est associé à des cassures doubles brins de l'ADN et nécessite l'activité de l'enzyme AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*). AID est codée par le gène *AICDA* et appartient à la famille de déaminases APOBEC (*Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide-like*) (Muramatsu *et al.*, 1999). Cette enzyme déamine une cytosine en uracile (Figure 8). Le mésappariement dU-dG qui en résulte peut être traité de différentes manières. D'une part, la mutation peut être ignorée et considérée comme une thymidine générant alors une transition dC en dT par les ADN polymérase répliquatives haute fidélité. D'autre part, l'excision du dU peut se faire par l'Uracyle DNA Glycosylase (UNG) à l'origine d'un site abasique pris en charge par les complexes de réparation/excision de la voie BER (*Base Excision Repair*). Ce système de réparation clive l'ADN et des ADN polymérase translésionnelles peu fidèles insèrent aléatoirement une des quatre bases à la place du site abasique aboutissant alors à une transition, une transversion ou à la reconstitution de la cytosine initiale.

La voie du MisMatch Repair (MMR) peut également reconnaître le mésappariement dU-dG provoqué par AID. Cette reconnaissance fait intervenir l'hétérodimère MSH2/MSH6 (*MutS Homolog*) qui va recruter les protéines MLH1 (*MutL Homolog*) et PMS2 (*Post Meiotic Segregation 2*) responsables de l'élimination de l'uracile générant ainsi une cassure simple brin. Le facteur PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) recrute des polymérase infidèles conduisant à des mutations de type transition ou transversion (Peled *et al.*, 2008).



**Figure 8 : Les voies de réparation impliquées dans le processus d'hypermutation somatique.**

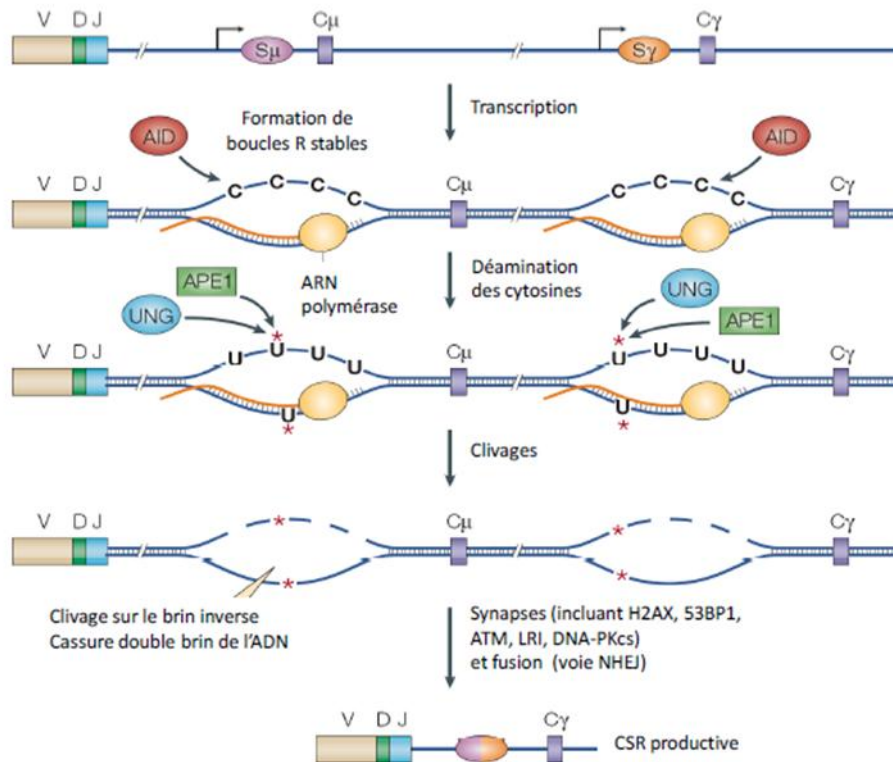
Le mésappariement dU-dG généré par AID peut être pris en charge de différentes manières. A gauche, la mutation peut être ignorée et considérée comme une thymidine générant alors une transition dC en dT par les ADN polymérases. Au milieu, l'enzyme UNG crée un site abasique pris en charge par la voie du BER et les ADN polymérases translésionnelles peu fidèles insèrent aléatoirement une des quatre bases à la place du dU. A droite, la voie du MisMatch Repair (MMR) reconnaît le mésappariement dU-dG et permet d'éliminer l'uracile conduisant à une cassure simple brin. Le recrutement de polymérases peu fidèles provoque l'apparition de mutations de type transition ou transversion (modifié d'après Peled et al., 2008).

AID: Activation-Induced cytidine Deaminase ; BER : Base Excision Repair UNG : Uracyl DNA Glycosylase

### 1.5.2 Commutation de classe ou isotypique

La commutation de classe permet à l'immunoglobuline exprimée de changer d'isotype c'est-à-dire que d'IgM elle se transforme en IgA, IgG ou IgE. Ce mécanisme a pour but de changer les fonctions effectrices de l'immunoglobuline (cf. paragraphe 1.1) (pour revue: Chaudhuri and Alt, 2004).

Au cours de la commutation de classe, le gène réarrangé  $VDJ_H$  est juxtaposé à un nouveau segment constant de classe différente. Chaque segment constant de la chaîne lourde, à l'exception de  $C\delta$ , est précédé d'une séquence d'ADN appelée région S pour « switch ». La recombinaison s'effectue entre la région donneuse  $S_\mu$  et une région S acceptrice (Figure 9).



**Figure 9 : Mécanisme de la commutation de classe.**

La transcription, qui se fait en amont des deux régions S (switch) impliquées, crée une boucle R ce qui fournit de l'ADN simple brin à AID. L'activité des enzymes AID, UNG et APE1 provoque des cassures de l'ADN prises en charge par le mécanisme NHEJ. L'ADN situé entre ces deux régions S est excisé tandis que les régions codantes sont liées entre elles afin de rapprocher un nouveau segment constant du segment VDJ réarrangé. (modifié d'après Chaudhuri and Alt, 2004).

AID: Activation-Induced Cytidine Deaminase ; APE1 : Apurinic/APyrimidic Endonuclease 1 ; NHEJ : Non Homologous End Joining ; UNG : Uracyl DNA Glycosylase

Le mésappariement dU-dG provoqué par l'enzyme AID au niveau des régions S est excisé par l'enzyme UNG créant alors un site abasique. Ce dernier est pris en charge par l'enzyme APE1 (*Apurinic/apyrimidic Endonuclease 1*) qui génère des cassures simples brins, suivies d'une phase de réparation impliquant la voie du NHEJ (*Non Homologous End Joining*).

## 1.6 Stades terminaux de la différenciation lymphocytaire B T-dépendante

### 1.6.1 Les cellules B mémoires

A la sortie des centres germinatifs, les lymphocytes B mémoires migrent dans la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires ou rejoignent la circulation sanguine. Ces cellules B constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capables de persister à



l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'Homme). Les lymphocytes B mémoires expriment une immunoglobuline de forte affinité d'isotype IgM, IgA, IgE, ou IgG. Ils sont générés suite à une réponse immunitaire primaire (première rencontre avec l'antigène) et jouent un rôle majeur dans la réponse secondaire en se différenciant rapidement en plasmocytes. Après une re-stimulation antigénique, seuls les lymphocytes B mémoires de type IgM auraient la capacité d'entrer à nouveau dans le centre germinatif pour subir à nouveau le processus d'hypermutation somatique au locus IgH et, facultativement, subir la commutation de classe (Dogan *et al.*, 2009). Ces cycles répétés au travers du centre germinatif augmentent à chaque fois l'affinité de l'immunoglobuline pour son antigène.

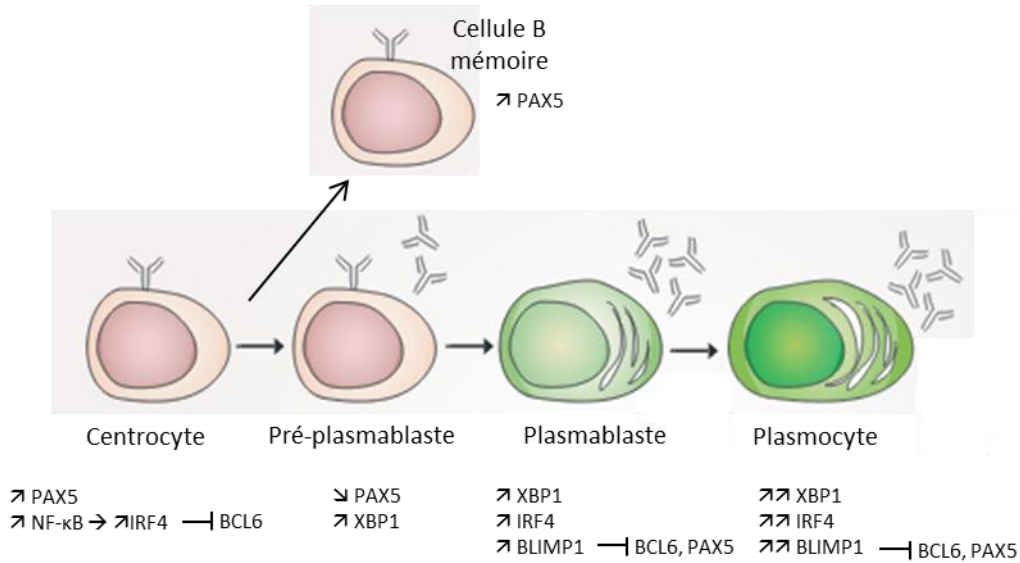
### 1.6.2 Les plasmocytes

Les plasmocytes, exprimant le CD38 et CD138 (Syndecan-1), sont les effecteurs de la réponse immunitaire humorale grâce à la production et à la sécrétion d'anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme (pour revue : Calame, 2001).

A ce stade, les cellules n'expriment plus les marqueurs du lignage B tels que le CD20 ou CD79B. La régulation négative de BCL6 constitue la première étape de la différenciation plasmocytaire. Elle entraîne une levée de la répression de l'expression de BLIMP1 (*B lymphocyte induced maturation protein 1*), régulateur essentiel de la différenciation plasmocytaire (Shaffer *et al.*, 2000). En effet, des souris déficientes pour le gène codant BLIMP1 (*PRDM1*) ne génèrent pas de plasmocytes (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Le facteur BLIMP1 agit également sur la répression du facteur PAX5 (Lin *et al.*, 2002).

Un autre facteur est essentiel à la fonction sécrétrice des plasmocytes : il s'agit de XBP1 (*X-Box binding Protein 1*), dont l'expression est induite par BLIMP1. XBP1 est impliqué dans l'augmentation de la taille des cellules ainsi que de l'activité mitochondriale, du nombre de ribosomes et de la synthèse de protéines (Shaffer *et al.*, 2004).

Enfin, IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) joue lui aussi un rôle dans la différenciation plasmocytaire en régulant négativement BCL6 (Klein *et al.*, 2006) (Figure 10).



**Figure 10** : Stades terminaux de la différenciation lymphocytaire B et programmes transcriptionnels associés  
L'expression des facteurs de transcription PAX5, IRF4 et BLIMP1 au cours de la différenciation terminale des cellules B est représentée.

### 1.7 Différenciation lymphocytaire B en périphérie : réponse T-indépendante

Bien que la réponse immunitaire de type humorale soit essentiellement dépendante des lymphocytes T auxiliaires, les caractéristiques structurales de certains antigènes peuvent conduire à l'activation du lymphocyte B de manière T-indépendante et donc à la production d'anticorps dirigés contre ces antigènes. Les antigènes thymo-indépendants de type I conduisent à une activation polyclonale des lymphocytes B et sont considérés comme des mitogènes des cellules B. Ceux de type II sont caractérisés par des structures répétitives (Mond *et al.*, 1995) permettant l'agrégation des récepteurs BCR, suffisante à elle seule pour activer la cellule B. La réponse immunitaire initiée par les antigènes thymo-indépendants de type II ne serait pas complètement indépendante des cellules T (Mond *et al.*, 1995); cependant leur rôle exact n'est pas encore compris. La maturation des cellules B en réponse à des antigènes T-indépendants pourrait se faire en dehors des centres germinatifs. Ces cellules B matures résident dans la zone marginale et sont caractérisées par l'expression conjointe de l'IgM et de l'IgD. Chez l'Homme, ces cellules seraient soumises à un processus de prédiversification du répertoire avant la rencontre avec l'antigène cela durant l'enfance (Weller *et al.*, 2008). La prédiversification du répertoire dépend d'AID et correspond à l'acquisition de mutations somatiques à faible taux (< 5%) sur les gènes de la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines ou *IGHV*.

## 2. Les grands mécanismes de transformation associés à la lymphomagenèse B

Les lymphomes constituent un groupe de cancers des cellules du lignage lymphoïde, à localisation ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, liés à la transformation néoplasique d'une cellule lymphocytaire. Les lymphomes se classent en deux grandes catégories: d'une part les lymphomes hodgkiniens (ou maladie de Hodgkin) et d'autre part les lymphomes non-hodgkiniens (LNH).

Les lymphomes lymphoblastiques sont les cancers des précurseurs lymphocytaires médullaires ou thymiques et sont équivalents aux leucémies aiguës lymphoblastiques. Les lymphomes périphériques sont dérivés d'un lymphocyte post-médullaire ou post-thymique. Ces derniers sont les lymphomes qui nous intéressent. Les LNH périphériques de lignage B sont les plus fréquents et représentent environ 85% des cas. Ils constituent un groupe hétérogène de tumeurs dont la fréquence augmente avec l'âge. Cliniquement, on distingue deux types de LNH-B périphériques : les lymphomes indolents (ou de bas grade de malignité), à évolution plutôt lente et les lymphomes agressifs (ou de haut grade, à évolution rapide). Les lymphomes sont aujourd'hui classés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO pour *World Health Organization*) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes publiée en 2001, puis réactualisée en 2008.

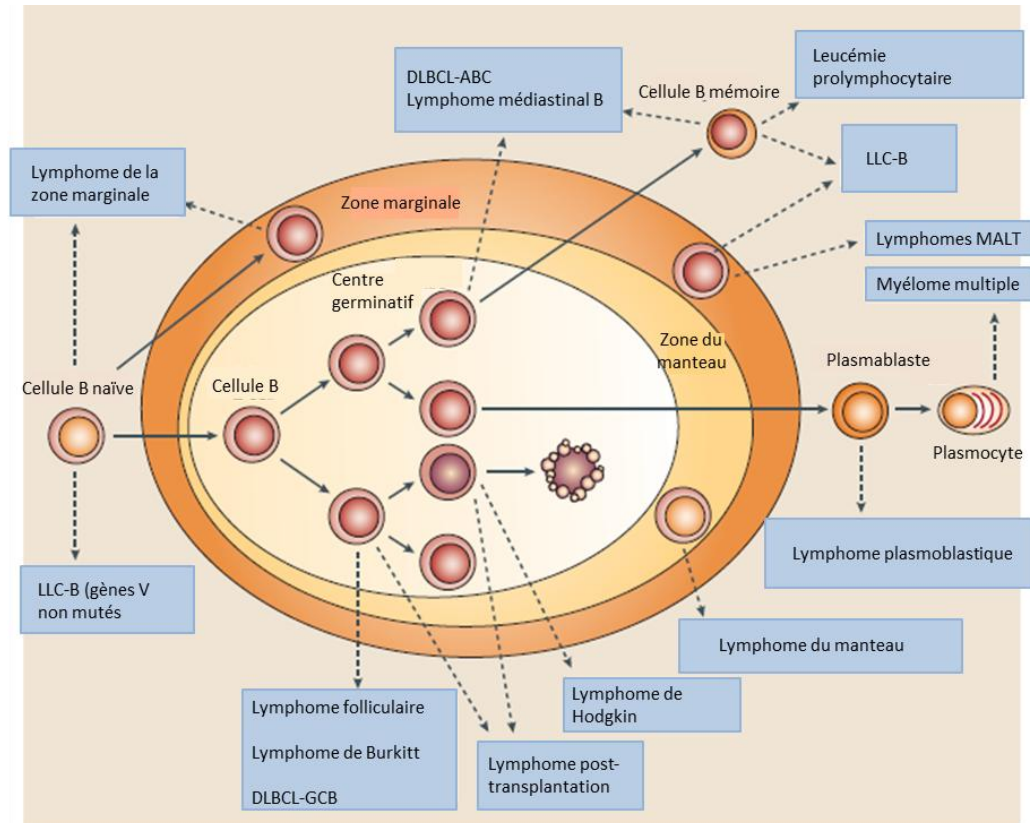
Parmi les principaux lymphomes indolents, il y a la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome folliculaire, le lymphome du MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) et les lymphomes de la zone marginale. Les lymphomes agressifs, quant à eux, comprennent notamment les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), les lymphomes de Burkitt et les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés.

### 2.1 Origine cellulaire des lymphomes B

De manière générale, la plupart des lymphomes B sont définis par rapport à une contrepartie bénigne. Parler de l'origine cellulaire des lymphomes B revient nécessairement à corréler le phénotype et le génotype des cellules tumorales à un stade normal de la différenciation B puisqu'il est impossible de suivre la dérive d'un lymphocyte B sain en cellule tumorale. Toute cellule tumorale aurait un équivalent normal : les cellules tumorales sont supposées bloquées à un stade précis de différenciation reflétant ainsi leur origine et une

association à un programme oncogénique particulier. Cependant, dans certains lymphomes comme la maladie de Waldenström, les cellules tumorales présentent un spectre de différenciation (allant des cellules du petit lymphocyte mature aux plasmocytes) indiquant un blocage incomplet de la différenciation.

Les principaux types de lymphomes B périphériques, reliés à leur équivalent non-tumoral, sont présentés dans la Figure 11.



**Figure 11 : L'origine cellulaire des lymphomes B.**

Les lymphomes sont désignés par rapport à une contrepartie bénigne. Les flèches continues indiquent les étapes de la maturation normale des cellules B dans le centre germinatif tandis que les flèches en pointillé désignent les lymphomes initiés à partir de la cellule saine correspondante. (modifié d'après Küppers, 2005).

DLBCL : lymphomes B diffus à grandes cellules (ABC pour Activated B cells ou GCB pour Germinal center B cells) ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; MALT : Mucosa Associated Lymphoid Tissue

D'après la classification WHO de 2008, la plupart des LNH B ont pour origine un lymphocyte B du centre germinatif tel que le lymphome de Burkitt, ou post-centre germinatif tel que 50-60% des DLBCL.

Toutefois, des travaux ont montré que dans un contexte pathologique le processus d'hypermutation somatique pouvait aussi avoir lieu à l'extérieur des centres germinatifs ne permettant donc pas de prendre en compte la présence de mutations au niveau des gènes

codant les immunoglobulines d'une cellule tumorale comme une preuve définitive d'une origine centre germinatif ou post-centre germinatif (pour revues : Shaffer *et al.*, 2002 ; Küppers, 2005).

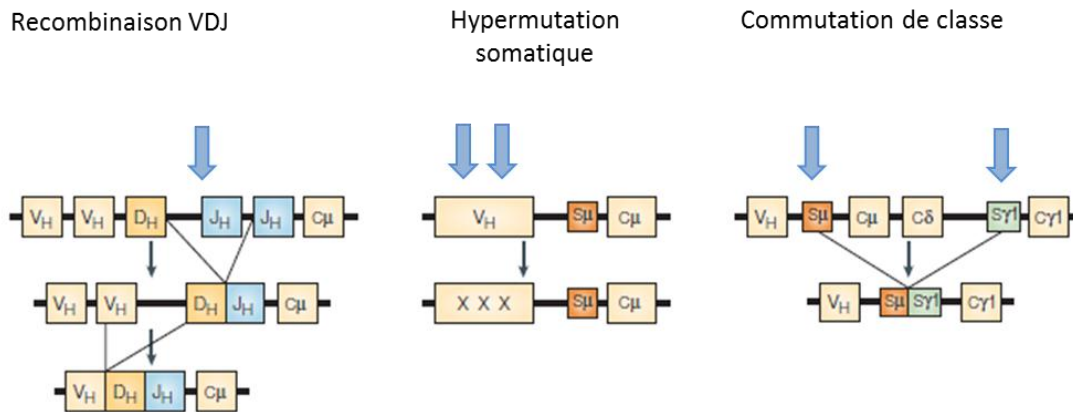
## 2.2 Mécanismes de la lymphomagenèse B

Les processus à l'origine de la diversité du répertoire B peuvent conduire à des translocations chromosomiques oncogéniques qui bloquent la différenciation, empêchent l'apoptose et/ou induisent la prolifération. La réponse à l'antigène peut également être source d'événements dangereux.

### 2.2.1 Événements géniques transformants

Les translocations chromosomiques réciproques impliquant un des loci des gènes d'immunoglobulines et un proto-oncogène sont la marque caractéristique de nombreux types de lymphomes B (Küppers and Dalla-Favera, 2001). La conséquence de telles translocations réside dans le fait que l'oncogène est placé sous le contrôle d'un des loci des gènes d'immunoglobulines conduisant à une dérégulation de son expression (Klein, 1986). Les événements géniques transformants peuvent être qualifiés de primaire (événement initial de la transformation cellulaire) ou secondaire (événement additionnel acquis lors de la progression tumorale) : la translocation de *MYC* constitue l'événement oncogénique primaire dans le lymphome de Burkitt tandis que son amplification dans le lymphome folliculaire représente un événement secondaire.

Trois types de cassure sont retrouvés au niveau des loci d'immunoglobulines (Figure 12).



**Figure 12 :** Les trois points critiques de cassure et de translocation au locus IgH.

Les événements géniques responsables du remaniement des gènes de chaîne lourde d'immunoglobulines génèrent des cassures de l'ADN pouvant être à l'origine de translocations. Les flèches bleues indiquent les différents points de cassure et de réarrangements. (modifié d'après Küppers, 2005).

Le premier type a lieu lors des réarrangements des gènes d'immunoglobulines dans la moelle osseuse, le second lors de l'hypermutation somatique, et le troisième lors de la commutation de classe. Les translocations oncogéniques peuvent survenir lors des réarrangements des gènes codant les immunoglobulines. En effet, les réarrangements VDJ, au stade pro-B dans la moelle osseuse, impliquent des cassures doubles brins de l'ADN par les enzymes RAG. Normalement ces cassures sont réparées par le système de réparation du NHEJ. Parfois ces cassures ne sont pas résolues correctement conduisant à des translocations chromosomiques.

Par exemple, le point de cassure peut être directement adjacent à la région J<sub>H</sub> ou peut se produire au niveau de la jonction entre la région D<sub>H</sub> et la région J<sub>H</sub>. C'est le cas de la translocation t(11;14)(q13;q32) impliquant le gène codant la cycline D1 (*BCL1*) et le locus IgH dans le lymphome du manteau. C'est également le cas de la translocation *BCL2-IgH* associée au lymphome folliculaire. Ces deux translocations surviennent au cours d'un défaut du processus de recombinaisons VDJ dans la moelle osseuse. Toutefois, des travaux de l'équipe de B. Nadel suggèrent que la translocation t(14;18) pourrait éventuellement se produire au cours de réarrangements secondaires lors du processus de révision du BCR (*cf* paragraphe 1.4.4) (Nadel *et al.*, 2001).

Le processus d'hypermutation somatique génère aussi des cassures de l'ADN et peut donc également conduire à des translocations réciproques. Il semblerait que ce soit le cas de la

translocation *IgH-MYC* retrouvée dans le lymphome de Burkitt endémique (cf. chapitre IV) (Goossens *et al.*, 1998). Le point de cassure est alors rencontré à l'intérieur ou à proximité des segments VDJ réarrangés.

Le dernier événement susceptible d'entraîner des translocations est le processus de commutation de classe qui génère lui aussi des cassures de l'ADN. Dans ce cas, le point de cassure est localisé dans les régions « switch » des régions constantes. Ce mécanisme est à l'origine de plusieurs translocations associées au myélome multiple : translocation des gènes des cyclines D1 et D3. La commutation de classe est aussi à l'origine de la translocation *IgH-MYC* du lymphome de Burkitt sporadique (Neri *et al.*, 1988) (pour revues : Shaffer *et al.*, 2002 ; Küppers, 2005) (Tableau 1).

Lymphome	Translocations chromosomiques	Mutations de gènes suppresseurs de tumeurs
Lymphome du manteau	CCDN1-IgH (95%)	ATM (40%)
Lymphome lymphoïde chronique B		ATM (30 %), TP53 (15 %)
Lymphome folliculaire	BCL2-IgH (90 %)	
Lymphome B diffus à grandes cellules	BCL6-différents partenaires (35%), BCL2-IgH (15-30 %), MYC-IgH ou MYC-IgL (15 %)	CD95 (10-20 %), ATM (15 %), TP53 (25 %)
Lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B		SOCS1 (40 %)
Lymphome de Burkitt	MYC-IgH ou MYC-IgL (100 %)	TP53 (40 %), RB2 (20-80 %)
Lymphome de Hodgkin classique		IKBA (10-20 %), IKBE (10 %), CD95 (< 10 %)
Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire	BCL6-différents partenaires (48 %)	
Lymphome du MALT	API2-MALT1 (30 %), BCL10-IgH (5 %), MALT1-IgH (15-20 %), FOXP1-IgH (10 %)	CD95 (5-80 %)
Lymphome lymphoplasmacytoïde	PAX5-IgH (50 %)	
Myélome multiple	CCND1-IgH (15-20 %), FGFR3-IgH (10 %), MAF-IgH (5-10 %)	CD95 (10 %)

**Tableau 1 : Translocations chromosomiques et mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la lymphomagenèse.**

Les pourcentages entre parenthèses indiquent le pourcentage de cas porteurs de l'anomalie génique répertoriés. (modifié d'après Küppers, 2005).

Bien que les translocations chromosomiques impliquant les gènes d'immunoglobulines soient une caractéristique associée à la plupart des lymphomes B, d'autres événements géniques sont impliqués dans la lymphomagenèse B. L'hypermutation somatique contribue à la lymphopathogenèse en ciblant d'autres gènes que ceux des immunoglobulines. Par exemple des

mutations inactivatrices du gène *CD95* codant la protéine FAS sont retrouvées dans environ 20% des lymphomes post centre germinatif ce qui aurait pour effet de protéger les cellules tumorales de l'induction de la mort par le ligand du CD95 (Gronbaek *et al.*, 1998). Ces autres événements correspondent, également, à des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* (Gaidano *et al.*, 1991) ou l'inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B *IKB $\alpha$*  (*Inhibitor of  $\kappa$ B*) (Jungnickel *et al.*, 2000). On peut aussi trouver des amplifications de gènes tels que l'amplification du gène *MDM2* aboutissant à l'inhibition de la voie P53 dans les DLBCL (Rosenwald *et al.*, 2002). Enfin, des délétions de gènes sont aussi retrouvées et notamment la délétion du gène *TNFAIP3* codant la protéine A20, inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, dans les ABC-DLBCL et le lymphome du MALT (Shaffer *et al.*, 2012).

Le développement du séquençage nouvelle génération (NGS) a permis d'identifier des mutations retrouvées dans les cancers hématologiques contribuant à une meilleure compréhension de la pathogenèse associée. Les mécanismes génétiques contribuant au développement des lymphomes non-hodgkiniens diffus à grandes cellules ont été identifiés en partie grâce au séquençage nouvelle génération, révélant des mutations récurrentes au niveau de gènes codant des composants de la signalisation du BCR (*CD79A*, *CD79B*, *CARD11*) (Lenz *et al.*, 2008a ; Davis *et al.*, 2010) (Pour revue Rossi *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Rôle de l'activation continue du BCR

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression d'un BCR fonctionnel est un élément capital pour la prolifération et la survie des lymphocytes B au cours de leur développement. La sélection pour l'expression du BCR semble aussi s'appliquer aux cellules tumorales. La plupart des cellules tumorales expriment un BCR, bien que parfois le niveau d'expression soit faible. L'hypothèse selon laquelle les signaux de survie délivrés par le BCR sont nécessaires vient du fait que les translocations au niveau des loci d'immunoglobulines sont majoritairement retrouvées au niveau de l'allèle non-productif. L'allèle exprimé n'étant pas inactivé par les translocations, il est suggéré que l'incapacité à générer un BCR fonctionnel serait incompatible avec la survie de la cellule B et son évolution en cellule tumorale, excepté dans le cas du lymphome de Hodgkin (Küppers, 2005).

L'étude des gènes *IGHV* apporte des informations quant à la maturation des lymphocytes B en réponse à l'antigène : *i*) l'absence de mutations somatiques dans les gènes *IGHV* réarrangés



signe généralement une origine pré-centre germinatif; *ii*) la présence de mutations somatiques *IGHV* témoigne de l'activité présente ou passée d'AID et l'existence d'une diversité intraclonale est considérée comme un stigmate de l'activité d'AID et donc d'une origine « centre germinatif » ; *iii*) un faible taux de mutations d'*IGHV* peut correspondre à une pré-diversification du répertoire en dehors du centre germinatif tel que décrit pour les lymphocytes B de la zone marginale ; *iv*) un fort taux de mutations *IGHV*, supérieur à 5%, avec une répartition non aléatoire sur les CDR témoigne à la fois d'une pression de sélection par l'antigène et d'un stade « post-centre germinatif ». Enfin les marqueurs membranaires ou intracellulaires spécifiques du stade de différenciation peuvent donner une indication sur l'origine de la cellule tumorale.

La présence d'un biais dans le répertoire des gènes des immunoglobulines est souvent considérée comme la preuve d'une sélection du progéniteur tumoral par l'antigène. Il peut s'agir d'auto-antigènes ou bien d'antigènes étrangers. La démonstration d'un rôle du BCR dans la lymphopathogenèse B provient de l'étude des lymphomes du MALT gastriques qui sont presque tous associés à une infection chronique de la muqueuse gastrique due à la bactérie *Helicobacter Pylori*. La lymphomagenèse associée à ce lymphome semble être une conséquence de la stimulation antigénique chronique du BCR des cellules B. Cette dernière est facilitée par les lymphocytes T auxiliaires qui reconnaissent *Helicobacter pylori* et qui stimulent alors la prolifération des lymphocytes B tumoraux (Hussell *et al.*, 1996). L'éradication d'*Helicobacter Pylori* par un traitement antibiotique s'accompagne d'une régression de la tumeur dans 75% des cas (Wotherspoon *et al.*, 1993).

Un autre exemple est celui des lymphomes de la zone marginale splénique pour lesquels on trouve dans certains cas un répertoire *IGHV* spécifique du virus de l'hépatite C (VHC). La stimulation antigénique chronique pourrait favoriser l'apparition de mutations oncogéniques au cours du processus lymphomatogène. Une fois le clone tumoral établi cette stimulation du BCR est toujours majeure puisqu'on observe la régression du lymphome après un traitement antiviral (Viswanatha and Dogan, 2007) (pour revue Küppers, 2005).

Parfois, la situation peut être plus subtile, comme pour les lymphomes folliculaires. Dans ces lymphomes, il a été montré que l'immunoglobuline est sélectionnée par son microenvironnement pour l'existence de sites de glycosylation au niveau du site antigénique, ce qui induit un biais de répertoire pour le réarrangement du gène *IGVH4-34* indépendamment de la stimulation antigénique (Radcliffe *et al.*, 2007).

Des travaux ont montré que les lymphocytes B de la leucémie lymphoïde chronique ou LLC sont fréquemment capables de reconnaître des auto-antigènes (Borche *et al.*, 1990) suggérant que l'état d'activation permanente du répertoire autoréactif par les antigènes du soi est impliqué dans les processus de transformation maligne du lymphocyte B. Le répertoire *IGVH* dans LLC est également biaisé et différent de la population B circulante normale (Fais *et al.*, 1998). Marcus Dühren-von Minden et col. ont montré que les cellules de LLC sont sujettes à une stimulation autonome du BCR indépendante de l'antigène (Dühren-von Minden *et al.*, 2012). Ces auteurs démontrent que le BCR de la LLC a pour propriété intrinsèque de s'auto-agréger. Cette auto-agrégation implique le CDR3 de l'*IGVH* et un épitope interne de l'immunoglobuline situé en dehors de la région variable.

Des travaux ont montré, dans des cellules primaires de lymphomes du manteau, que STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) est activé de manière constitutive ou en réponse à la signalisation du BCR, les deux processus délivrant des signaux de survie (Baran-Marszak *et al.*, 2010). Les cellules primaires de lymphomes du manteau présentent une dérégulation de la signalisation du BCR caractérisée par la phosphorylation constitutive de LYN (Boukhiar *et al.*, 2013). L'inhibition de l'activité kinase de LYN est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules de lymphomes du manteau (Boukhiar *et al.*, 2013).

Le rôle crucial de la signalisation du BCR dans la lymphomagenèse B est clairement illustré dans les lymphomes non-hodgkiniens diffus à grandes cellules de type « activé » ou ABC (*Activated B cell-like*). En effet dans environ 20% de ces lymphomes, les motifs ITAM des chaînes CD79A et/ou CD79B sont mutés rendant constitutive la signalisation du BCR (Davis *et al.*, 2010). L'inhibition des SRC kinases induit l'apoptose des lignées d'ABC-DLBCL mutées contrairement aux lignées non-mutées dont la prolifération est indépendante du signal BCR (Davis *et al.*, 2010). Nous reviendrons plus en détail sur ces lymphomes B dans la chapitre V.

### 2.2.3 Rôle du microenvironnement tumoral

Dans beaucoup de lymphomes, le microenvironnement tumoral semble important pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Dans les lymphomes folliculaires, les cellules tumorales résident et prolifèrent dans des structures folliculaires au sein desquelles elles sont associées à des lymphocytes T auxiliaires et des cellules dendritiques folliculaires. Certaines cellules B peuvent être retrouvées dans les aires interfolliculaires mais elles présentent une

prolifération réduite, suggérant la nécessité pour les cellules B de ce lymphome d'interagir avec d'autres types cellulaires que ceux de la zone interfolliculaire pour leur prolifération (Dogan *et al.*, 1998). Ces observations sont appuyées par des travaux qui ont montré que les cellules de lymphomes folliculaires ne peuvent proliférer *in vitro* que si elles sont cultivées en présence de cellules T CD4+ ou de cellules stromales et d'un anticorps dirigé contre le récepteur CD40 (Umetsu *et al.*, 1990 ; Johnson *et al.*, 1993).

Plusieurs autres travaux suggèrent l'importance du rôle du microenvironnement et les interactions réciproques entre les cellules tumorales et les cellules saines du microenvironnement telles que les cellules stromales. Ces dernières fournissent des facteurs tels que des ligands de la famille Hedgehog (*Sonic HedgeHog* ou SHH et *Desert HedgeHog* ou DHH) qui vont favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales (Dierks *et al.*, 2007 ; Mourcin *et al.*, 2012).

Dans le lymphome de Hodgkin, les cellules de Reed-Sternberg ont perdu l'expression des marqueurs spécifiques du lignage B mais conservent l'expression des molécules impliquées dans l'interaction avec les lymphocytes T CD4+ telles que les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, CD40, CD80 et CD86. La dépendance des cellules de Reed-Sternberg à leur environnement est également suggérée par la difficulté de maintenir ces cellules en culture et par leur rare dissémination dans le sang (Küppers, 2002).

#### 2.2.4 Rôle de l'infection par un virus

Certains virus peuvent favoriser l'émergence d'un syndrome lymphoprolifératif B. Soit en créant un contexte favorable tel que l'établissement d'un déficit immunitaire, c'est l'exemple du virus de l'immunodéficience humaine ou VIH. Soit grâce à l'action directe du virus sur le lymphocyte B au travers de son infection et grâce à l'effet transformant de ses protéines virales. Ce dernier cas est clairement illustré par le virus d'Epstein-Barr ou EBV. L'implication de l'EBV dans la lymphomagenèse B sera détaillée dans le chapitre II.

D'autres virus jouent un rôle dans la lymphomagenèse. C'est le cas du virus HHV-8 (*Human Herpes Virus 8*) découvert en 1994 dans un cas de sarcome de Kaposi associé au VIH (Chang *et al.*, 1994). Ce virus a également été mis en évidence dans d'autres pathologies lymphoprolifératives telles que les lymphomes primitifs des séreuses et la maladie de Castelman

(Chen *et al.*, 2007 ; Du *et al.*, 2007). HHV-8 pourrait participer à l'oncogenèse grâce à ses homologues de gènes cellulaires contrôlant la prolifération ou l'apoptose (Cesarman and Knowles, 1999).

Comme évoqué précédemment, le VHC (Virus de l'Hépatite C) est associé au développement de lymphomes non-hodgkiniens de phénotype B ou LNH-B (Pozzato *et al.*, 1994). L'importance de l'association entre VHC et LNH-B varie fortement en fonction de la localisation géographique et semble être plus forte avec les lymphomes de bas grade (Mazzaro *et al.*, 1996) tels que les lymphomes lymphoplasmocytaires (Silvestri *et al.*, 1998) ainsi que les lymphomes de la zone marginale splénique (Hermine *et al.*, 2002). L'infection par le VHC est aussi retrouvée dans les lymphomes de haut grade (De Vita *et al.*, 1997), beaucoup d'entre eux étant le résultat de la transformation de lymphomes de bas grade. La lymphomagenèse liée au VHC est indirecte et semble reposer sur la stimulation antigénique chronique (*cf.* Paragraphe 2.2.2).

## **II. Le virus d'Epstein-Barr (EBV)**

Cette seconde partie d'introduction bibliographique s'intéresse au principal virus transformant des lymphocytes B: le virus d'Epstein-Barr. Nous aborderons dans un premier temps des notions en rapport avec la taxonomie, l'épidémiologie et la biologie de ce virus. Puis nous décrirons les principales caractéristiques et fonctions des différentes protéines de latence ainsi que des ARN non-codants de l'EBV. Enfin, la physiologie de l'infection sera traitée ainsi que les différentes pathologies associées à ce virus.

### **1. Taxonomie et épidémiologie**

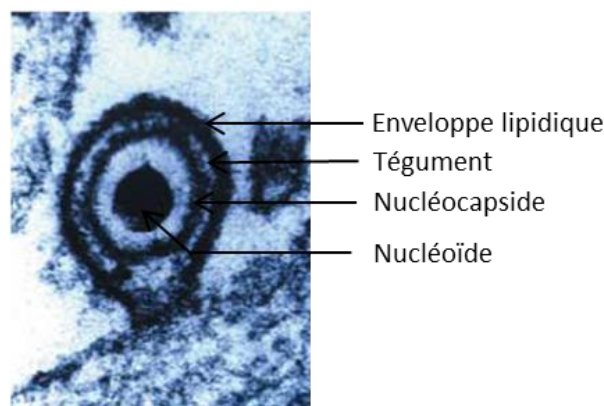
L'EBV, aussi appelé HHV-4 (*Human Herpes-Virus 4*), appartient à la famille des *Herpesviridae* humains, à la sous-famille des *Gamma-herpesvirinae* et au genre *Lymphocryptovirus*.

L'EBV infecte près de 95% de la population adulte mondiale. Il est essentiellement transmis par la salive et sa cible privilégiée est le lymphocyte B mais il peut aussi infecter les cellules T, NK et les cellules épithéliales.

Chez les enfants, la primo-infection est asymptomatique. Mais lorsqu'elle a lieu chez l'adulte jeune, elle peut parfois se manifester par une maladie lymphoproliférative bénigne et transitoire : la mononucléose infectieuse. Cette affection se traduit par un épisode infectieux aigu marqué par une forte fièvre et une période de fatigue de plusieurs semaines accompagnée d'un taux élevé de particules virales libérées dans la salive. La prolifération des lymphocytes B infectés par le virus est à l'origine d'une réponse immunitaire exagérée (réaction T/NK excessive) à l'origine des symptômes cliniques. Suite à la primo-infection, le virus de l'EBV persiste durant toute la vie de l'individu dans les lymphocytes B mémoires.

## 2. Biologie de l'EBV

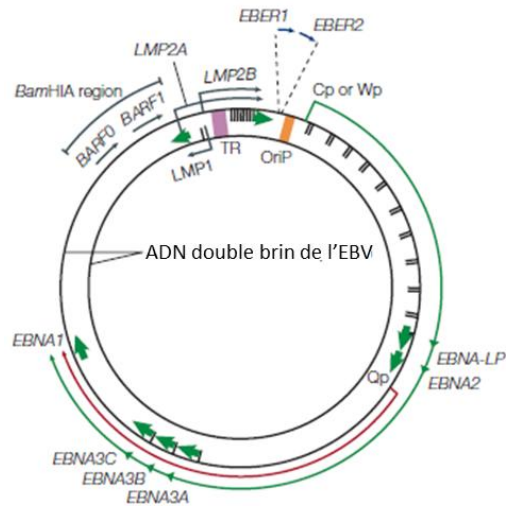
L'EBV est un virus à ADN double brin dont le génome est d'environ 172 kb. La particule virale (ou virion) de 120 à 200 nm est composée d'une enveloppe lipidique contenant des glycoprotéines virales qui vont servir à la fixation du virus sur sa cellule hôte (cf. paragraphe 6.1), du tégument composé de protéines d'aspect fibrillaire, d'une nucléocapside de forme icosaédrique (20 faces, 12 sommets) et enfin du nucléoïde ou core constitué du génome viral sous forme linéaire enroulé autour de structures protéiques (Figure 13).



**Figure 13 :** Structure du virion de l'EBV en microscopie électronique.

Dans le virion, le génome de l'EBV est sous forme linéaire et enroulé autour de protéines pour former le nucléoïde. Le virion est composé d'une enveloppe lipidique contenant des glycoprotéines qui vont servir à l'attachement du virus sur la cellule hôte, du tégument et d'une nucléocapside. (modifié d'après Young and Rickinson, 2004).

Une fois dans la cellule hôte, l'ADN du virus se circularise et persiste ainsi à l'état épisomal dans le noyau des cellules infectées sans s'intégrer au génome cellulaire (Adams and Lindahl, 1975) (Figure 14).



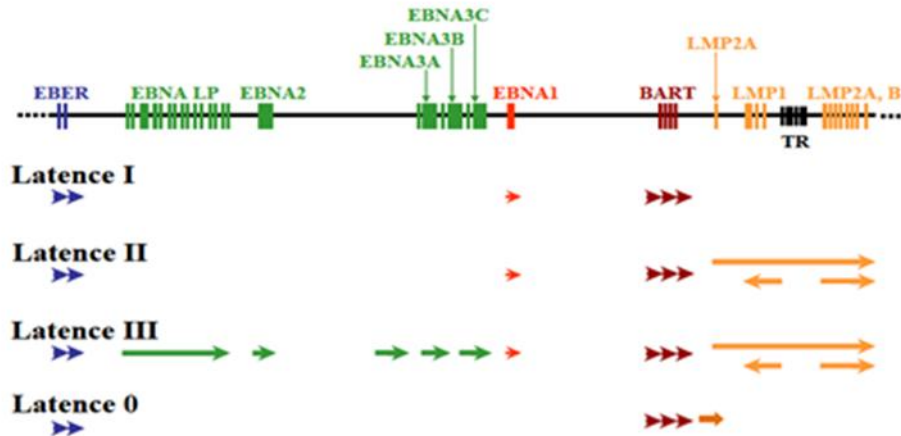
**Figure 14 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme d'épisome.**

Les flèches vertes représentent les régions codantes des protéines de latence comprenant EBNA1, EBNA2, EBNA3A, -3B, -3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B. Les flèches bleues représentent les ARN transcrits non traduits (EBER-1 et EBER-2). Cp, Wp et Qp sont les trois promoteurs de latence. (modifié d'après Young and Rickinson, 2004).

BARF : BamHI-A Rightward Frame ; EBER : EBV-Encoded RNA ; EBNA : EBV-Encoded Nuclear Antigens ; LMP : Latent Membrane Proteins ; OriP : origine de réplication latente ; TR : terminal repeat

Deux types d'infection sont décrits : l'infection lytique à l'origine de la production et de la libération de particules virales et l'infection latente qui permet le maintien de la structure épisomale au sein des cellules infectées favorisant ainsi leur prolifération et la persistance de l'EBV. Le génome de l'EBV contient plusieurs origines de réplication : deux origines OriLyt fonctionnelles durant la phase lytique et une origine OriP fonctionnelle durant la phase latente. Trois promoteurs de latence sont décrits : Cp, Wp et Qp. Lors de l'entrée dans le cycle lytique, la transcription est sous le contrôle d'un quatrième promoteur, le promoteur Fp. Ces promoteurs sont responsables de l'expression des protéines nucléaires virales et leur utilisation sera détaillée dans le paragraphe 3 de ce chapitre.

Durant la phase de latence, seuls quelques gènes viraux, appelés gènes de latence, sont exprimés. Les produits des gènes de latence sont les protéines EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*), les protéines LMP (*Latent Membrane Protein*), les ARN EBER (*EBV-Encoded small nonpolyadenylated RNAs*), les transcrits BART (*BamHI A Rightward Transcripts*) et les micro-ARN. Il existe quatre types de latences virales (0, I, II et III) en fonction de la combinaison de gènes viraux exprimés (Figure 15). Quelle que soit le type de latence, l'expression des ARN EBER et des transcrits BART est retrouvée.



**Figure 15 : Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction des différents types de latences virales.**  
 Quelle que soit la latence on observe l'expression des transcrits EBER et BART. Les ARN codant la protéine LMP2A sont parfois détectés dans la latence 0. La latence 1 se caractérise par une expression de la protéine EBNA1. La latence II se définit par une expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B. La latence III est caractérisée par l'expression de l'ensemble des protéines de latence. (modifié d'après Young et al., 2000).

La latence 0 est observée dans les lymphocytes B mémoires du sang périphérique. L'ARN codant la protéine EBNA1 et celui codant LMP2A sont parfois détectés.

La latence de type I se caractérise par l'expression de la protéine EBNA1 ; elle est retrouvée dans les cellules du lymphome de Burkitt lorsqu'il est associé à l'EBV.

La latence de type II se caractérise par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B ; elle est associée au carcinome du rhinopharynx, aux lymphomes T/NK et au lymphome de Hodgkin.

La latence de type III, décrite dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés, est caractérisée par l'expression de l'ensemble des protéines de latence, à savoir EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B. L'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B par l'EBV conduit à l'obtention d'une lignée lymphoblastoïde ou LCL en latence III.

En plus de ces quatre types de latence, des latences atypiques ont été décrites, notamment dans certains cas de lymphomes de Burkitt endémiques. Seul le promoteur Wp est fonctionnel, ces latences sont dites « Wp-restreintes » (Kelly et al., 2002). Les protéines EBNA1, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C et une forme tronquée d'EBNA-LP sont exprimées. Les souches d'EBV à l'origine de ces latences atypiques présentent une délétion du gène codant la protéine EBNA2. Les gènes codant les protéines LMP étant dépendants d'EBNA2, leur expression n'est pas retrouvée.



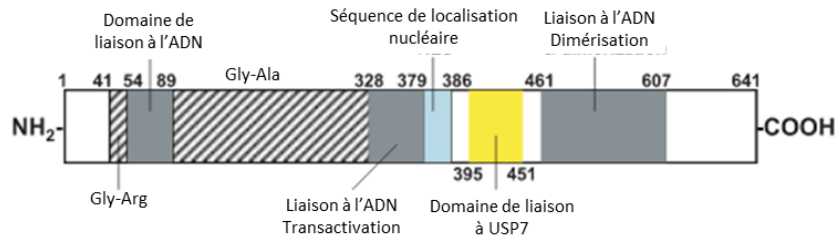
Enfin, quelques mots sur la phase lytique. Episodiquement, la réactivation lytique intervient dans les cellules B mémoires infectées par l'EBV, conduisant à la mort de la cellule hôte et à la libération de particules virales ce qui contribue au maintien et à la diffusion de l'EBV dans l'organisme.

L'expression des gènes conduisant à la production de virions s'effectue de manière séquentielle et ordonnée, impliquant dans un premier temps deux gènes très précoces : *BZLF1* et *BRLF1* qui codent respectivement la protéine ZEBRA (*Z Epstein-Barr Replication Activator* aussi connue sous le nom de Zta) et le transactivateur Rta. Ces deux protéines contrôlent l'expression des gènes précoces (Chavrier *et al.*, 1989) impliqués dans la réplication de l'ADN. Les dernières protéines exprimées sont codées par des gènes tardifs permettant la formation de la capside virale (Tsurumi *et al.*, 2005).

### 3. Les antigènes nucléaires EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*)

#### 3.1 EBNA1

Différents promoteurs peuvent initier des transcrits EBNA1 en fonction du programme de latence exprimé dans la cellule. Dans les étapes précoces de l'infection, la transcription d'EBNA1 est initiée au niveau du promoteur Wp puis plus tardivement par le promoteur Cp (Bodescot *et al.*, 1986 ; Woisetschlaeger *et al.*, 1990). Le promoteur de latence Qp peut également initier la transcription d'EBNA1 notamment pendant les phases de latence I et II où les promoteurs Wp et Cp sont réprimés par méthylation (Schaefer *et al.*, 1995). Lors de l'entrée dans le cycle lytique, la transcription est sous le contrôle du promoteur Fp (Schaefer *et al.* 1995). La protéine EBNA1 est composée de 641 acides aminés et comprend plusieurs domaines : une région riche en glycines et arginines, un domaine riche en glycines et alanines, et une séquence de localisation nucléaire. La partie carboxy-terminale comprend un domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (Ambinder *et al.*, 1991) (Figure 16).



**Figure 16 : Représentation schématique de la structure de la protéine EBNA1.**

Plusieurs domaines la composent : une région riche en glycines et arginines, un domaine riche en glycines et alanines, une séquence de localisation nucléaire, un domaine de liaison à USP7 trois domaines de fixation à l'ADN. (modifié d'après Iwakiri et al., 2006).

USP7 : Ubiquitin Specific-processing Protease

EBNA1 est la protéine de latence nécessaire à la réplication et à la maintenance de l'épisome viral dans les cellules filles. Pour ce faire, les homodimères EBNA1 se lient aux chromosomes cellulaires et au niveau des séquences FR (*Family of Repeats*) et DS (*Dyad Symmetry*) de l'origine de réplication OriP. EBNA1 est également capable de se fixer sur le promoteur viral Qp pour réguler sa propre expression (Nonkwelo et al., 1996). EBNA1 interagit aussi avec des promoteurs de gènes impliqués dans la croissance cellulaire tels que le gène codant la cycline D1, ou dans la migration, tels que ceux codant les chémokines CCL3 et CCL4 (*C-C motif Ligands 3 and 4*) (Canaan et al., 2009, Hebner et al., 2003, Leight and Sugden, 2000).

Bien qu'EBNA1 soit nécessaire au maintien de l'épisome, elle ne semble pas indispensable à la transformation. En effet, l'équipe de A. Schepers a réussi à établir des LCLs après infection de lymphocytes B par des virions déficients pour EBNA1 (Humme et al., 2003). Toutefois, il a été suggéré qu'EBNA1 pourrait agir comme un facteur de transcription modulant l'expression de gènes cellulaires potentiellement importants pour l'oncogenèse tels que les gènes *RAG1* et *RAG2* (Srinivas and Sixbey, 1995) et le gène *BCL-XL* (Tsimbouri et al., 2002). Il a été aussi montré qu'EBNA1 active la sous-unité catalytique p91 de la NADPH oxydase 2 (NOX2) conduisant à la génération d'espèces réactives oxygénées qui vont contribuer, en coopération avec d'autres événements oncogéniques, à l'instabilité génomique (Gruhne et al., 2009). EBNA1 est également impliquée dans l'inhibition de l'apoptose en se liant à la désubiquitinase USP7, ce qui conduirait à une diminution du niveau de P53 dans la cellule (Kennedy et al., 2003 ; Saridakis et al., 2005). Ceci permettrait au virus de persister *in vivo* et constituerait ainsi un facteur de survie pour la cellule tumorale du lymphome de Burkitt. Néanmoins, les fonctions oncogéniques d'EBNA1 restent débattues puisque les modèles murins surexprimant EBNA1 générés par M.S. Kang ne développent pas de lymphomes (Kang et al., 2005 ; Kang et al., 2008).

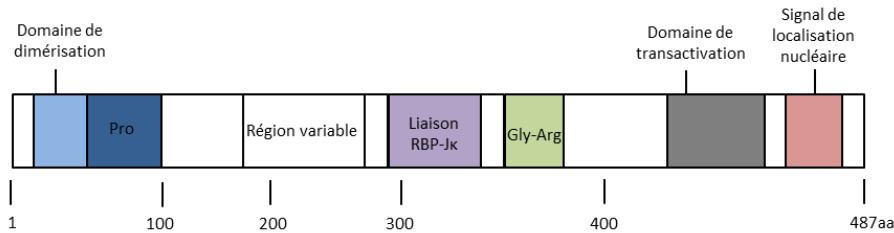
EBNA1 aurait aussi une fonction dans l'évasion immunitaire grâce à sa région amino-terminale riche en glycines-alanines qui empêche la dégradation d'EBNA1 par le protéasome bloquant ainsi sa présentation par les molécules du CMH de classe I aux lymphocytes T cytotoxiques (Levitskaya *et al.*, 1997).

### 3.2 EBNA2

C'est le promoteur Wp, puis Cp qui initie la transcription d'EBNA2 (Bodescot *et al.*, 1986). EBNA2 est associée à la latence de type III et constitue, avec EBNA-LP, les premiers produits viraux exprimés après l'introduction du génome viral dans le noyau de la cellule hôte. L'importance du rôle d'EBNA2 dans la transformation cellulaire a été mise en évidence par la caractérisation d'une souche virale d'EBV incapable d'immortaliser les lymphocytes B *in vitro*: la souche P3HR-1 (Miller *et al.*, 1974). Le séquençage de P3HR-1 et la comparaison avec la souche immortalisante de référence B95.8 ont révélé une délétion au niveau de la région codant EBNA2 et une partie d'EBNA-LP. La réintroduction du gène codant EBNA2 restaure la capacité de transformation du virus et a permis d'identifier les domaines fonctionnels de cette protéine (Cohen *et al.*, 1989).

Il existe deux variants d'EBNA2 : EBNA2A et EBNA2B qui diffèrent par leur taille, à savoir 487 et 443 acides aminés respectivement (Addinger *et al.*, 1985). Ces deux variants sont à l'origine de la distinction entre deux souches de l'EBV, EBV-A et EBV-B dont la répartition géographique est différente. EBV-A et EBV-B sont retrouvés en Afrique ainsi qu'en Nouvelle-Guinée, mais la souche EBV-A est également retrouvée en Occident.

La protéine EBNA2 comprend un domaine amino-terminal chargé négativement qui jouerait un rôle dans l'homodimérisation de la protéine. Ce domaine comprend aussi une région riche en prolines, et une région impliquée dans l'interaction avec la protéine CBF1 (*Centromere Binding Factor 1*)/RBP-Jk (*Recombination-Binding Protein Jkappa*) (protéine effectrice de la voie Notch). La partie carboxy-terminale se compose d'un domaine de transactivation et de la séquence de localisation nucléaire (Figure 17).



**Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la protéine EBNA2.**

Différents domaines constituent EBNA2 : un domaine de dimérisation, une région riche en prolines, une région variable, un domaine de liaison avec le facteur RBP-Jk, un domaine riche en glycines et arginines, un domaine de transactivation ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire. (modifié d'après Zimmer-Strobl and Strobl, 2001).

Arg : Arginine ; Gly : Glycine ; Pro : Proline ; RBP-Jk : Recombination-Binding Protein Jkappa

EBNA2 se fixe à l'ADN par l'intermédiaire de la protéine cellulaire CBF1/RBP-Jk (Grossman *et al.*, 1994). Par son mécanisme d'action, EBNA2 est considéré comme l'homologue fonctionnel viral de la partie active du récepteur Notch.

EBNA2 est un puissant transactivateur des gènes viraux codant les protéines EBNA par l'intermédiaire du promoteur Cp et également des gènes codant les protéines LMP. EBNA2 régule aussi l'expression de gènes cellulaires comme *MYC*, *CD23*, *FGR*, *CD21* (Kaiser *et al.*, 1999 ; Cordier *et al.*, 1990 ; Knutson, 1990).

### 3.3 EBNA-LP (Leader Protein ou EBNA-5)

L'expression d'EBNA-LP est concomitante à celle d'EBNA2 lors de la latence III grâce également aux promoteurs Wp et Cp. EBNA-LP joue un rôle important dans l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*, sans pour autant être indispensable à ce processus (Mannick *et al.*, 1991).

EBNA-LP favorise la transition G0/G1 du cycle cellulaire, en coopération avec EBNA2 (Sinclair *et al.*, 1994). EBNA-LP se fixe aux protéines pRb (Rétinoblastome), P53 et p14ARF (inhibe la dégradation de P53), suggérant son rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Szekely *et al.*, 1993 ; Kashuba *et al.*, 2003).

Des travaux ont montré une interaction de EBNA-LP avec les protéines chaperonnes HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) et BAG2 (*BCL2 associated Athanogene 2*), suggérant que EBNA-LP pourrait être impliquée dans le système de contrôle de la qualité des protéines et

potentiellement dans la reconnaissance de structures protéiques anormales (Forsman *et al.*, 2008).

### 3.4 Les EBNA3 (-3A, -3B et -3C)

La transcription des gènes codant les protéines EBNA3 est également sous la dépendance des promoteurs Wp et Cp (Bodescot *et al.*, 1986). Ces facteurs nucléaires sont donc exprimés lors de la latence III de l'EBV. Comme EBNA2, les EBNA3 fixent l'ADN par l'intermédiaire de la protéine CBF1/RBP-Jκ (Robertson *et al.*, 1996). Ils régulent ainsi négativement la transactivation des gènes par EBNA2 (Waltzer *et al.*, 1996). Si les protéines EBNA3A et EBNA3C sont essentielles à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Tomkinson *et al.*, 1993), la délétion de la région codant EBNA3B n'affecte ni la transformation ni la croissance des LCL *in vitro* (Chen *et al.*, 2005).

Dans les cellules B infectées par l'EBV, EBNA3C est capable d'interagir avec MYC ce qui provoque une stabilisation de la protéine MYC augmentant alors la transcription de ses gènes cibles (Bajaj *et al.*, 2008). EBNA3C est également capable d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M en réponse à des drogues génotoxiques (Krauer *et al.*, 2004 ; Wade and Allday, 2000).

Il a aussi été montré que EBNA3C participe à l'ubiquitination et à la dégradation de P53 via une stabilisation de la protéine MDM2 (*Murine double minute 2*) (Saha *et al.*, 2009). D'autres travaux ont démontré que EBNA3C favorise la transition G1/S des cellules infectées par l'EBV en stabilisant la cycline D1 (Saha *et al.*, 2011).

## 4. Les protéines de membranes LMP (*Latent Membrane Protein*)

### 4.1 LMP1

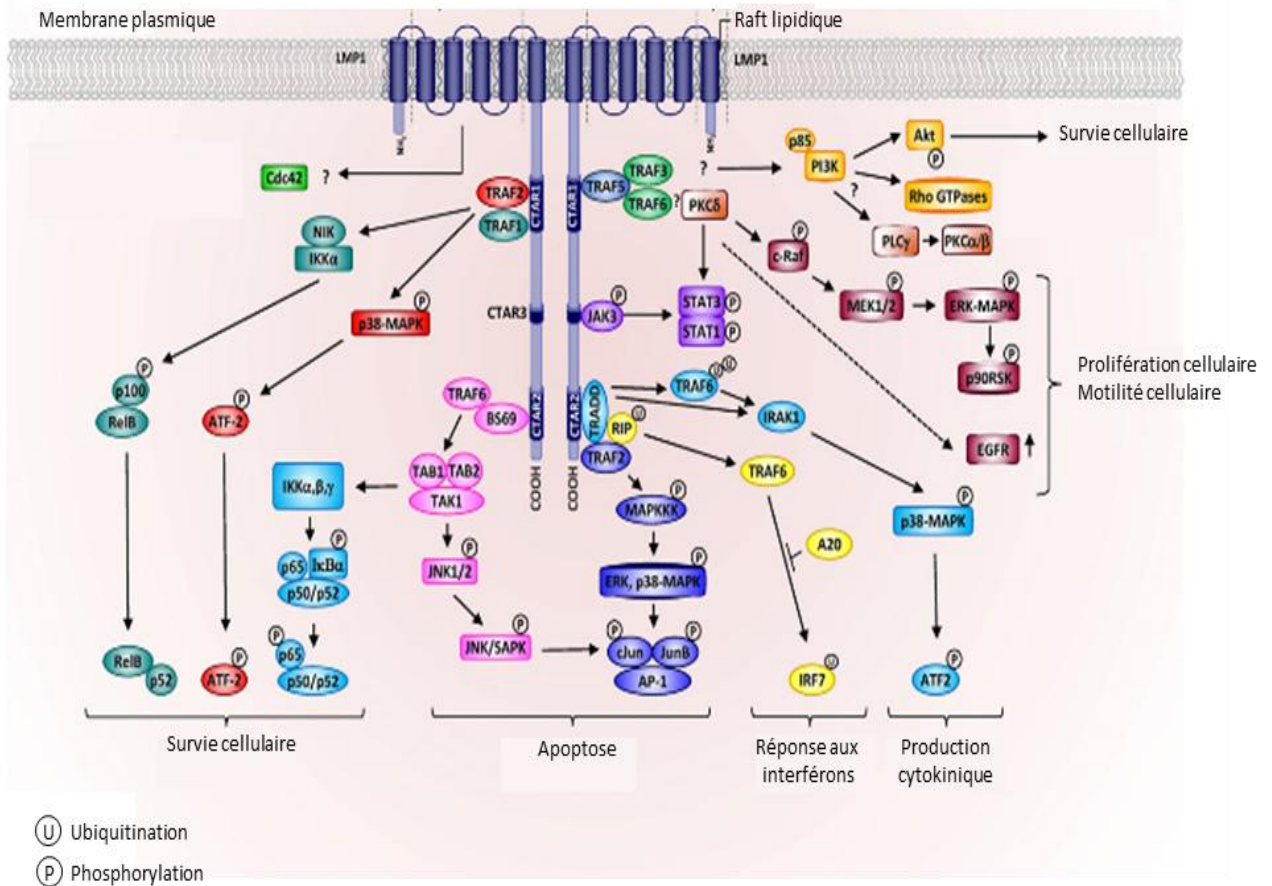
La protéine LMP1 est codée par le gène *BNLF1* (*BamH1 N Leftward Frame 1*). Deux promoteurs à l'origine de la transcription de LMP1 ont été décrits : TR-L1 et ED-L1. Le promoteur TR-L1 est actif dans les cellules épithéliales (latence de type II) grâce à l'action de protéines cellulaires telles que les protéines de la famille STAT (Chen *et al.*, 2001). Le promoteur ED-L1 dirige l'expression de LMP1 lors de la latence III dans les LCLs. Le transactivateur principal de ce promoteur est la protéine EBNA2.

LMP1 est indispensable à l'immortalisation *in vitro* des cellules B par l'EBV (Kaye *et al.*, 1993) et son expression *in vivo* permet le développement de lymphomes (Kulwichit *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2012). En ce sens, cette protéine est considérée comme étant l'oncogène majeur de l'EBV.

LMP1 est une protéine de 63 kDa composée de 386 acides aminés (Figure 18). La structure de LMP1 peut être divisée en trois domaines : un segment amino-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire composé de 6 boucles hydrophobes et un domaine carboxy-terminal cytoplasmique comprenant les régions CTAR1, CTAR2 et CTAR3 (*C-Terminal Activation Regions*). CTAR1 et CTAR2 sont nécessaires à l'immortalisation des lymphocytes B (Izumi *et al.*, 1999).

LMP1 est une protéine transmembranaire agissant comme un mimétique du récepteur CD40. Ce dernier, qui appartient à superfamille des récepteurs au TNF $\alpha$ , donne au lymphocyte B les signaux de survie nécessaires à sa sélection dans le centre germinatif. *In vivo*, si l'on remplace la partie signalisatrice de CD40 par celle de LMP1, on observe un développement normal des cellules B (Rastelli *et al.*, 2008). Au contraire, si l'on rend constitutif le signal CD40 en remplaçant son domaine amino-terminal et transmembranaire par celui de LMP1, cela conduit au développement de lymphomes B à cinétique lente (Hömig-Hölzel *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que l'effet transformant de LMP1 tient très probablement au caractère constitutif des signaux initiés.

La signalisation induite par LMP1 détourne les facteurs TRAF (*TNF-Associated Factors*) de la voie d'activation du récepteur CD40 (Mosialos *et al.*, 1995). Les protéines TRAF interagissent avec CTAR1 directement ou avec CTAR2 de manière indirecte *via* une interaction avec la protéine TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*) (Eliopoulos and Young, 2001). LMP1 permet l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la voie NF- $\kappa$ B, la voie des MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et la voie PI3Kinase (*Phosphatidylinositol3-Kinase*). Notons que LMP1 est capable d'initier l'activation des voies classique et alternative NF- $\kappa$ B qui seront décrites dans le chapitre VI (Laherty *et al.*, 1992 ; Luftig *et al.*, 2004).



**Figure 18 : Structure et fonctions signalisatrices de la protéine LMP1.**

LMP1 se compose d'une séquence amino-terminale cytoplasmique, de six domaines transmembranaires et d'une longue queue cytoplasmique carboxy-terminale. Cette dernière comporte les domaines CTAR indispensables à l'initiation de la signalisation induite par LMP1. LMP1 est capable d'activer, par l'intermédiaire des domaines CTAR1, CTAR2 et CTAR3, la voie NF-κB (classique et alternative), la voie des MAPK (p38, ERK et JNK) et la voie PI3K/AKT. (modifié d'après Dawson et al., 2012).

ATF : Activating Transcription Factor ; CTAR : Carboxy-Terminal Activation Region ; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor ; ERK : Extracellular Regulated Kinase ; IκB : Inhibitor of NF-κB ; IKK : IκB Kinase ; IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase ; IRF : Interferon Regulatory Factor ; JAK : Janus Kinase ; JNK : c-Jun N-terminal Kinase ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; NIK : NF-κB Inducing Kinase ; PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase ; STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription ; TRAF : TNFR-Associated Factors ; TRADD : TNFR-Associated Death Domain ; RIP : Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein ; TAK1 : TGF-Beta Activated Kinase 1

#### 4.2 LMP1/NF-κB et transformation cellulaire

C'est le groupe d'Eliot Kieff qui a mis en évidence, pour la première fois, le pouvoir transformant de la protéine LMP1 : la xéno greffe de fibroblastes exprimant LMP1 chez des souris immunodéprimées (souris *nude*) conduit au développement de tumeurs (Wang et al., 1985). L'inhibition de NF-κB dans ces cellules bloque l'effet transformant de LMP1. Aujourd'hui, de nombreux travaux appuient ce résultat et placent NF-κB au centre des dérégulations induites par LMP1.

En activant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, LMP1 induit l'expression de protéines anti-apoptotiques (BCL2 et c-IAPs) et d'interleukines (IL-6 et IL-8) (Eliopoulos *et al.*, 1999 ; Pai and Khanna, 2001). La voie classique d'activation NF- $\kappa$ B est induite grâce au domaine CTAR2 de LMP1 qui recrute et interagit avec les protéines TRADD et RIP (*Receptor Interacting serine/thréonine Protein*). La liaison avec ces protéines adaptatrices va permettre le recrutement des molécules TRAF (TRAF2, 5 et 6), responsables (avec TAK1 pour *TGF-Beta Activated Kinase 1*) de l'activation du complexe IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) (Soni *et al.*, 2007). La voie alternative NF- $\kappa$ B, quant à elle, est initiée à partir du domaine CTAR1 de la protéine LMP1, capable d'interagir avec les facteurs TRAF1, 2, 3 et 5 (Saito *et al.*, 2003 ; Luftig *et al.*, 2004).

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que LMP1 conduit à la surexpression de l'ADN polymérase  $\beta$  grâce aux complexes NF- $\kappa$ B p50/c-Rel (Faumont *et al.*, 2009). La surexpression de cette enzyme est associée à un phénotype mutateur, lui-même associé à de nombreux cancers (Canitrot *et al.*, 1999).

LMP1 participe aussi au processus d'apoptose par l'intermédiaire de la surexpression du récepteur pro-apoptotique CD95/FAS (LeClourenec *et al.*, 2006). L'effet cytotoxique de LMP1 est observé lorsque cette protéine est fortement exprimée (Hammerschmidt *et al.*, 1989). D'autres études menées au laboratoire ont montré que la protéine LMP1 sensibilise les cellules à l'action des lymphocytes T cytotoxiques *via* l'induction de l'expression du CD95/FAS (Le Clourenec *et al.*, 2006). L'activation de NF- $\kappa$ B par LMP1 induit la sécrétion de l'interféron  $\gamma$ , responsable de l'activation secondaire de STAT1 qui est pro-apoptotique (Najjar *et al.*, 2005). Cette dernière propriété est en apparente contradiction avec le statut d'oncogène de LMP1 décrit précédemment. C'est pourquoi la notion d'oncogène ambivalent a été proposée pour LMP1, puisque selon son niveau d'expression, LMP1 favoriserait soit la survie (niveau d'expression faible), soit l'apoptose (niveau d'expression élevé). Ce concept d'oncogène ambivalent n'est pas sans rappeler les propriétés du facteur MYC (*cf.* Chapitre III).

#### 4.3 LMP2A et LMP2B

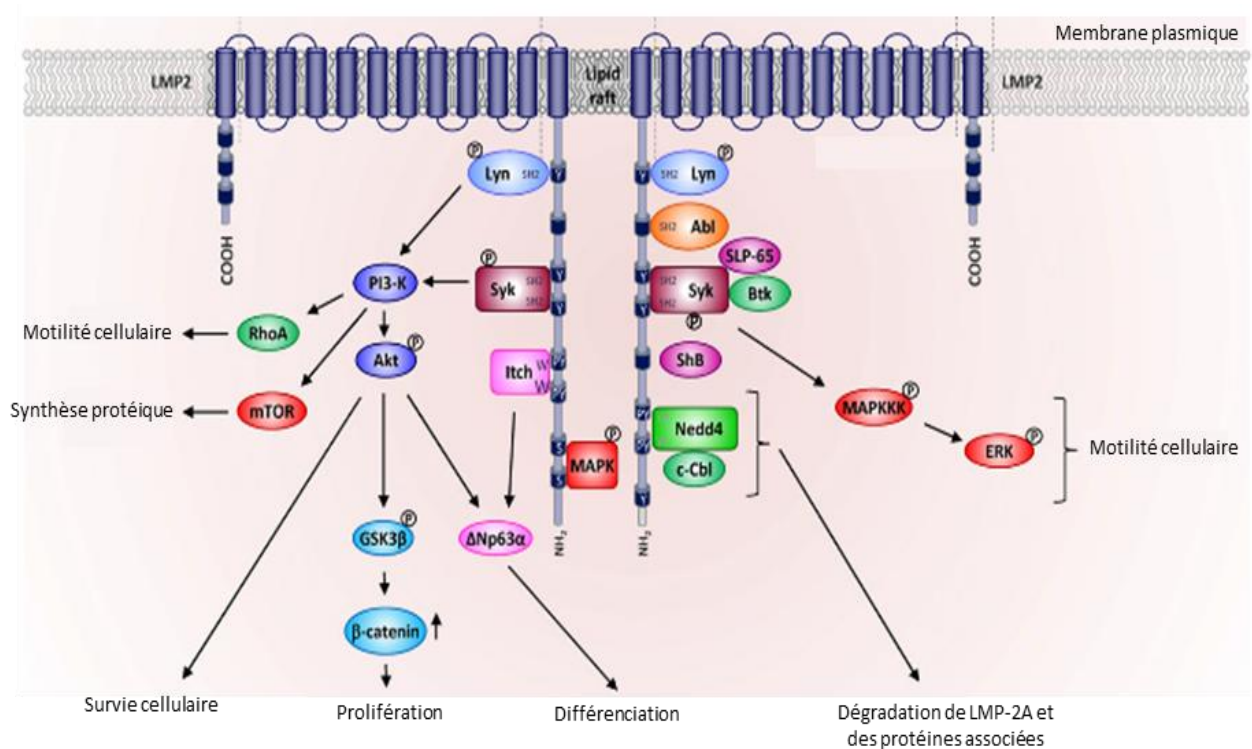
Les deux formes de LMP2, LMP2A et LMP2B, sont obtenues par un épissage alternatif. LMP2A et LMP2B ne sont pas essentiels à l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B (Longnecker *et al.*, 1993) mais ces protéines semblent contribuer à l'efficacité de



l'immortalisation (Briellemeier *et al.*, 1996). *In vivo*, LMP2A participe au maintien du virus à l'état latent (Fukuda and Longnecker, 2005).

LMP2A et -2B sont constituées d'un domaine carboxy-terminal suivi de douze domaines transmembranaires. La partie amino-terminale de LMP2A assure la transduction du signal. Cette partie est déletée pour LMP2B.

Une des propriétés principales de la protéine LMP2A est de mimer et diminuer le signal induit par le BCR (Miller *et al.*, 1995) En effet, LMP2A possède un motif ITAM ce qui lui permet d'interagir avec les tyrosines kinases cellulaires LYN et SYK impliquées dans la signalisation du BCR (Burkhardt *et al.*, 1992) (Figure 19).



**Figure 19 : Représentation schématique de la signalisation induite par LMP2A.**

La phosphorylation de LMP2A au niveau de tyrosines lui permet d'interagir avec les tyrosines kinases LYN et SYK de la signalisation du BCR et avec l'ubiquitine ligase NEDD4 conduisant à l'activation des voies MAPK, SAPK/JNK, Wnt/ $\beta$ -caténine et PI3K/AKT. L'activation de ces différentes voies de signalisation par LMP2A favorise la survie/prolifération et la motilité cellulaire ainsi que la différenciation. (modifié d'après Dawson *et al.*, 2012).

AKT : AK Transforming ; BTK : Bruton Tyrosine kinase ; ERK : Extracellular Regulated Kinase ; GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin ; NEDD4 : Neural precursor cell-Expressed developmentally down-regulated gene 4 ; PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase

Des données sur des souris transgéniques LMP2A montrent que cette protéine ne présente pas de propriétés oncogéniques mais peut remplacer le BCR dans un contexte RAG

déficient, leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (Caldwell et al. 1998 ; Caldwell et al. 2000). En mimant la signalisation du BCR, LMP2A intervient aussi dans l'inhibition de l'apoptose induite par le TGF $\beta$ 1 via l'activation de la voie PI3K/AKT (Fukuda and Longnecker, 2004). Quant à LMP2B, elle module l'activité de LMP2A en empêchant la phosphorylation de son motif ITAM (Rovedo and Longnecker, 2007).

## 5. Les ARN non codants

### 5.1 Les ARN EBER

Les ARN EBER 1 et 2 sont de petits ARN non-polyadénylés et non-codants de 166 et 172 nucléotides respectivement transcrits par l'ARN polymérase III (Rosa *et al.*, 1981). Les ARN EBER sont exprimés aussi bien durant la phase de latence que pendant l'infection lytique (Weigel *et al.*, 1985). Des travaux indiquent que les EBER pourraient participer à la persistance du virus chez l'hôte en induisant l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que BCL2 et en conférant une résistance contre l'effet anti-viral des interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  (Takada and Nanbo, 2001). Les ARN EBER sont également capables d'induire la production d'une cytokine immunosuppressive : l'IL-10 (Kitagawa *et al.*, 2000).

### 5.2 Les transcrits BART

Les transcrits de la région BART ont été identifiés sur des coupes de tissus de carcinome du rhinopharynx (Gilligan *et al.*, 1990), puis dans d'autres cancers associés à l'EBV tels que la maladie de Hodgkin et le lymphome de Burkitt. La délétion de la région BART n'altère pas l'immortalisation des lymphocytes B, suggérant que ces transcrits ne jouent pas un rôle essentiel dans ce processus (Robertson *et al.*, 1994).

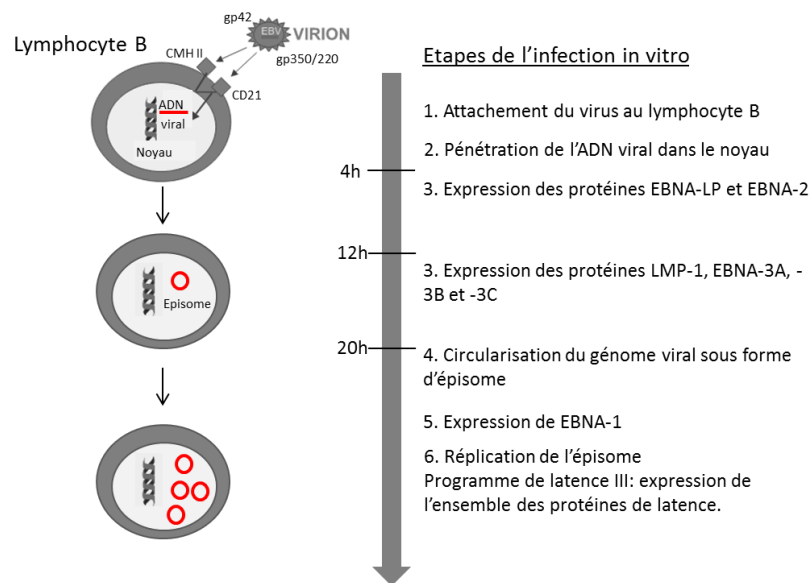
En 2004 les premiers micro-ARN de l'EBV ont été découverts au sein des introns de la région BART (miR-BART) (Pfeffer *et al.*, 2004). Plusieurs travaux indiquent que ces miR-BART pourraient participer à la pathogenèse associée à l'EBV. Prenons pour exemple, le micro-ARN miR-BART22 qui régule négativement l'expression de la protéine LMP2A participant à l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par l'EBV (Lung *et al.*, 2009). D'autres micro-ARN, tels que le miR-BART2, favorisent le maintien de la latence en diminuant

l'expression de l'ADN polymérase BALF5 (*BamHI A Leftward reading Frame 5*) initiatrice du cycle lytique (Barth et al. 2008). Enfin, le miR-BART5 favorise la survie cellulaire en réprimant l'expression de la protéine pro-apoptotique PUMA (*P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*) (Choy et al., 2008).

## 6. Physiologie de l'infection

### 6.1 L'infection par l'EBV in vitro

Les étapes de l'infection des lymphocytes B *in vitro* par l'EBV sont représentées dans la Figure 20.



**Figure 20 : Représentation de l'infection des lymphocytes B par l'EBV in vitro.**

L'EBV se fixe au lymphocyte B grâce à la gp350/220 qui reconnaît le récepteur CD21. La gp42 (reconnue par le CMH de classe II) permet la fusion de la membrane plasmique et de la nucléocapside puis l'ADN viral linéaire transite jusqu'au noyau. Les premières protéines exprimées, 4h après le début de l'infection, sont EBNA2 et EBNA-LP puis LMP1 et les EBNA3s (12h post-infection). Le génome viral se circularise sous forme d'épisome puis EBNA1 est exprimé (20h post-infection). Le programme de latence III de l'EBV est alors exprimé (expression de l'ensemble des protéines de latence). (modifié d'après Middeldorp et al., 2003).

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; EBNA : EBV-encoded Nuclear Antigens ; gp : glycoprotéine ; LMP : Latent Membrane Protein

L'infection par l'EBV débute par sa fixation sur le récepteur CD21 et sur le CMH de classe II par l'intermédiaire des glycoprotéines de l'enveloppe virale gp350/220 et gp85/25/42 respectivement (Tanner et al., 1987). Après pénétration du virus, le génome viral sous forme linéaire, transite jusqu'au noyau. Grâce au promoteur viral Wp, les premières protéines virales

de latence sont exprimées à savoir EBNA2 et EBNA-LP, environ 4 heures post-infection. Après 12 heures d'infection ce sont les protéines LMP1, EBNA3A, -3B et -3C qui sont exprimées, sous l'action d'EBNA2, grâce au promoteur viral Cp. Le génome viral se circularise sous forme d'épisome grâce aux régions terminales répétées. La réplication de l'épisome se fait en même temps que celle des chromosomes cellulaires au cours de la phase de synthèse de l'ADN. Suite à l'expression de LMP2A, -2B, des ARN EBER et des transcrits BART la latence virale de type III est établie. Les cellules transformées peuvent proliférer de manière autonome environ vingt-quatre heures après l'infection ce qui conduit à l'établissement d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde ou LCL (*Lymphoblastoid Cell Line*) caractérisée par une latence III (pour revue : Middeldorp *et al.*, 2003).

## 6.2 L'infection par l'EBV *in vivo*

Avant d'infecter les cellules B de l'oropharynx, le virus doit franchir une barrière de cellules épithéliales, ces dernières étant dépourvues du récepteur CD21. Cependant, l'existence de pathologies épithéliales associées à l'EBV, telles que l'hyperplasie chevelue de la langue de patients infectés par le VIH, suggère que le virus est capable d'infecter les cellules épithéliales *in vivo*.

L'attachement de l'EBV aux cellules épithéliales pourrait impliquer la protéine virale gH/gL et des intégrines exprimées à la surface des cellules épithéliales (Borza *et al.*, 2004).

Cependant, la présence de cellules épithéliales infectées par l'EBV n'a jamais été détectée dans les amygdales de sujets atteints de mononucléose infectieuse.

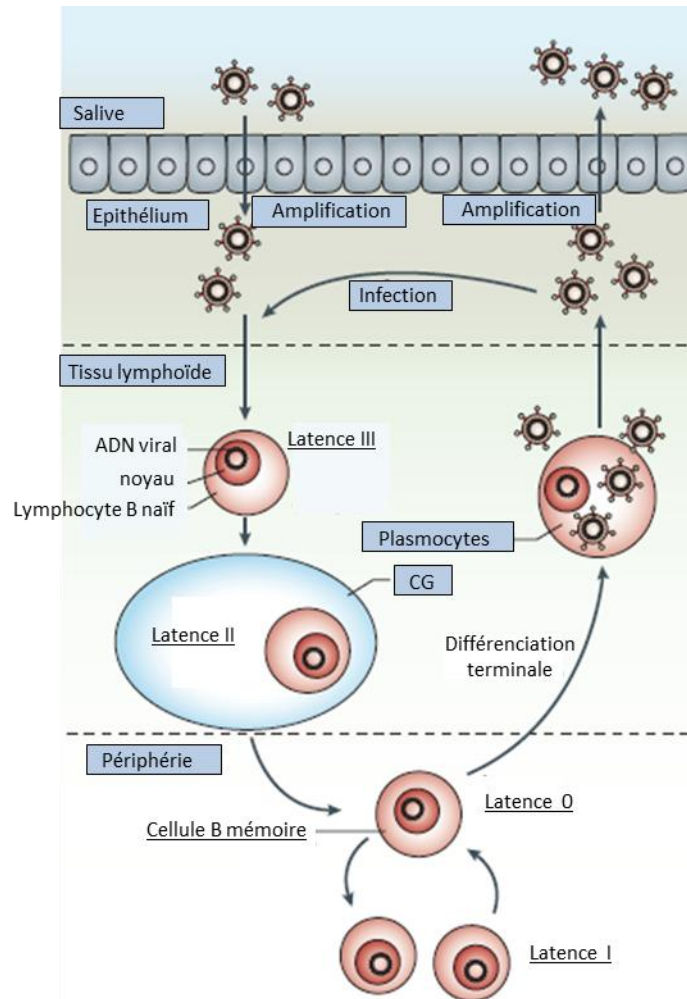
Une autre hypothèse proposée est que l'EBV infecte directement les lymphocytes B ce qui implique un contact entre les cellules B et les virions (Anagnostopoulos *et al.*, 1995). En effet, l'épithélium oropharyngé peut être interrompu par des cellules lymphoïdes qui infiltrer les couches épithéliales formant un « lymphoépithélium ». Il est possible que l'EBV exploite cette structure pour infecter de manière directe les lymphocytes B.

Selon le modèle de D. Thorley-Lawson, lors de la primo-infection, les lymphocytes B naïfs infectés sont tout d'abord caractérisés par une latence de type III ou programme de prolifération. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2 de ce chapitre, la latence III permet la prolifération des lymphocytes B. A ce titre elle est nommée « programme de prolifération ».

Cette première phase d'invasion virale déclenche une réponse immunitaire qui aboutit progressivement à l'élimination de la plupart des cellules infectées. Cependant, certaines cellules B échappent à cette réponse immunitaire et passent alors dans les centres germinatifs du tissu lymphoïde de l'oropharynx. Au niveau des centres germinatifs, la latence III de l'EBV est convertie en latence II aussi appelée « programme de survie ». A la sortie des centres germinatifs, les cellules B évoluent vers un statut B mémoire caractérisé par une latence 0 et rejoignent la circulation générale :  $1/10^6$  lymphocytes B EBV positif dans le sang. La latence 0 qui n'autorise pas l'expression de protéine virale est responsable du maintien de l'EBV toute la vie de l'individu infecté. De façon continue et transitoire, ces lymphocytes B mémoires acquièrent un profil de latence I pour permettre le maintien du génome de l'EBV lors de leur auto-renouvellement (pour revue : Thorley-Lawson, 2008).

Cependant, ce modèle est débattu. D'autres travaux suggèrent que l'EBV pourrait directement infecter les lymphocytes du centre germinatif ou les cellules B mémoires sans intervenir dans la formation de centres germinatifs (Kurth *et al.*, 2003).

Episodiquement, et en association avec les signaux de différenciation plasmocytaire, les lymphocytes B mémoires infectés repassent en phase lytique conduisant à la production et à la libération de nouvelles particules virales. Ces dernières peuvent alors infecter d'autres cellules B ce qui entretient la persistance du virus dans l'organisme et sa production à bas bruit tout au long de la vie de l'individu. (Figure 21) (Thorley-Lawson *et al.*, 2013).



**Figure 21 : Modèle de l'infection persistante des lymphocytes B par l'EBV.**

Lors de la primo-infection, le virion peut infecter directement ou indirectement les lymphocytes B. Les cellules B infectées expriment une latence de type III ce qui permet leur prolifération. Après un passage au travers des centres germinatifs (expression d'une latence II), les cellules B infectées ayant échappé à la réaction immunitaire mise en place évoluent en lymphocytes B mémoires avec une latence 0 qui rejoignent la circulation générale. Episodiquement, une réactivation virale s'effectue permettant la production de nouveaux virions infectieux. (modifié d'après Thorley-Lawson, 2008).

CG : centre germinatif

## 7. L'EBV et la lymphomagenèse B

Comme déjà évoqué, l'EBV est associé à plusieurs lymphomes B dont le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les DLBCL du sujet âgé, et enfin les lymphomes B du sujet immunodéprimé après transplantation d'organe (PTLD, *Post-Transplant lymphoproliferative Disorder*) ou suite à l'infection par le VIH.

Le lymphome de Burkitt (cf. Chapitre IV) :

Les cellules tumorales présentent une latence de l'EBV de type I où seuls les ARN EBER, les BART et la protéine EBNA1 sont exprimés.

Deux hypothèses peuvent être avancées quant au rôle de l'EBV dans la genèse de ce lymphome. D'une part, la prolifération intense de lymphocytes B infectés par l'EBV en latence III ou II pourrait être à l'origine de la translocation du gène *MYC* dans le centre germinatif. Ou bien, l'EBV pourrait infecter un lymphocyte B du centre germinatif présentant déjà la translocation *IgH-MYC*. En effet, les lymphocytes B du centre germinatif peuvent être infectés *in vitro* engageant alors le programme de latence III (Babcock et al., 2000 ; Ehlin-Henriksson et al., 2003). Cette latence III donnerait alors un avantage de survie aux cellules sur-exprimant *MYC* (il s'agit de notre hypothèse de travail dans la Partie 1 du chapitre Résultats).

#### Le lymphome de Hodgkin :

Il est caractérisé par la présence de grandes cellules atypiques d'origine B appelées les cellules de Reed-Sternberg. Environ deux tiers des lymphomes de Hodgkin sont associés à l'EBV et les cellules tumorales présentent une latence de type II avec expression des ARN EBER et BART, des protéines EBNA1, LMP1 LMP2A. Les cellules de Reed-Sternberg présentent des réarrangements anormaux au niveau des gènes des immunoglobulines (pour revue : Küppers, 2002). Normalement, ces cellules devraient être éliminées par apoptose mais la cellule de Reed-Sternberg pourrait échapper à l'apoptose grâce aux protéines virales LMP1 et LMP2A qui, en mimant respectivement le récepteur CD40 et le BCR, délivrent des signaux de survie et de prolifération.

#### Les désordres lymphoprolifératifs des sujets immunodéprimés :

Chez les patients infectés par le VIH, l'immunosuppression causée par le SIDA constitue un facteur de risque dans l'émergence de lymphoproliférations. La réactivation de l'EBV est plus fréquente que chez les individus immunocompétents.

Les PTLD surviennent chez des patients ayant subi une transplantation d'organe ou de moelle osseuse et soumis à un traitement immunosuppresseur. La présence de l'EBV en latence III est détectée dans la quasi-totalité des cas (Timms *et al.*, 2003). L'EBV est responsable de l'évolution de 1 à 2% des cas de PTLD en DLBCL de type « activé » ou ABC. Un récent travail a montré que l'émergence de telles tumeurs *in vivo* chez la souris, est due au pouvoir tumorigène de LMP1 et à l'inhibition de la réponse immune impliquant les cellules T et NK (Zhang, 2012).

Les lymphomes non-hodgkiniens diffus à grandes cellules associés à l'EBV :

Les DLBCL constituent une pathologie agressive. 5 à 10% des cas du sujet immunocompétent sont associés à l'infection par l'EBV.

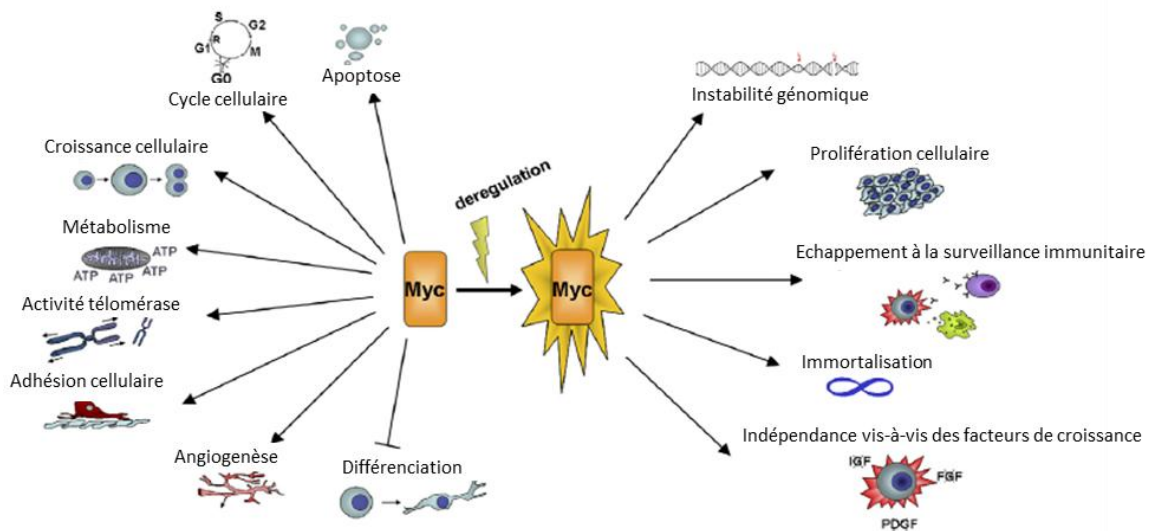
Des travaux ont été réalisés au laboratoire sur des cas de DLBCL associés à l'EBV afin d'étudier l'implication respective de la voie classique NF- $\kappa$ B et de la voie alternative (Chanut *et al.*, 2013). Les résultats obtenus ont permis de montrer un rôle majeur dans la tumorigenèse de la voie classique NF- $\kappa$ B *via* la régulation par RelA de gènes associés au métabolisme énergétique ou impliqués dans la survie, la progression dans le cycle cellulaire et la réponse immunitaire anti-tumorale. La voie alternative serait impliquée dans le maintien sur du long terme des tumeurs *via* RelB qui favorise la protection contre l'apoptose et la résistance face à un stress hypoxique.



### III. Le facteur de transcription MYC

Dans la première partie de ce chapitre, nous décrivons le facteur MYC, sa régulation ainsi que les nombreuses activités qu'il contrôle, puis nous expliquerons comment MYC coopère avec d'autres voies impliquées dans la transformation cellulaire promouvant ainsi la tumorigenèse.

Le facteur de transcription MYC est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (Vita and Henriksson, 2006) (Figure 22). De ce fait, un large spectre de cancers humains tels que les cancers hématopoïétiques, du sein, du colon, les cancers gastriques, les glioblastomes ou encore les mélanomes présente une expression élevée ou dérégulée de MYC (Pelengaris *et al.*, 2002a).



**Figure 22 : Mécanismes cellulaires contrôlés par MYC dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse.**

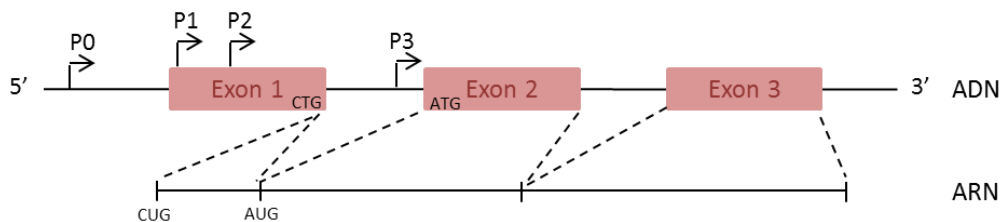
MYC est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la croissance cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le métabolisme, l'adhésion cellulaire, l'instabilité génomique ou encore l'angiogenèse. (modifié d'après Vita and Henriksson, 2006).

FGF : Fibroblast Growth Factor ; IGF : Insuline-like Growth Factor ; PDGF : Platelet Derived Growth Factor

A l'origine, le gène MYC a été identifié comme étant l'homologue cellulaire de l'oncogène V-MYC du virus de la myélocytomatose aviaire (Vennstrom *et al.*, 1982). Puis les gènes N-MYC et L-MYC ont été caractérisés chez l'Homme, respectivement, dans un neuroblastome et dans une lignée tumorale issue du poumon (Henriksson and Lüscher, 1996).

## 1. Structure du gène MYC

Le gène *MYC* est localisé sur le chromosome 8 chez l'Homme. La structure du gène *MYC* est représentée en Figure 23. Il est formé de trois exons dont le premier est non codant. Les deux autres exons (II et III) codent le facteur de transcription MYC. Le gène *MYC* humain contient quatre promoteurs : P0 situé dans la région 5' non traduite, P1 et P2 retrouvés au niveau du premier exon et enfin P3 localisé dans l'intron I. Dans les cellules normales, la majorité des transcrits sont initiés à partir des promoteurs P1 et P2. En effet 75 à 90% des transcrits sont initiés à partir de P2, 10 à 25% à partir de P1 et moins de 5% à partir des promoteurs P0 et P3 (Facchini and Penn, 1998 ; Wierstra and Alves, 2008).

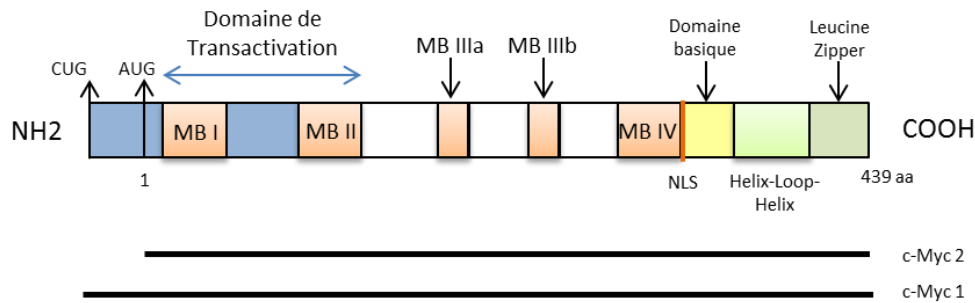


**Figure 23 :** La structure du gène *MYC*.

Les promoteurs P0, P1, P2 et P3 sont signalés par des flèches noires coudées. Les sites d'initiation de la traduction sont également représentés. (modifié d'après Facchini and Penn, 1998).

## 2. Structure de la protéine MYC

Le produit du gène *MYC* correspond à une protéine nucléaire hautement conservée (Figure 24). Les transcrits initiés à partir des promoteurs P1 et P2 codent les deux formes majeures de la protéine MYC : MYC1 (67kDa) et MYC2 (64kDa) respectivement. En général, les deux protéines sont exprimées. Néanmoins, dans des lignées de cellules tumorales telles que celles issues du lymphome de Burkitt, la forme MYC2 est majoritaire en raison d'un *switch* de promoteur de P1 à P2 (Hann *et al.*, 1994).



**Figure 24 : La structure de la protéine MYC.**

Les différents domaines qui composent la protéine MYC sont représentés: les MYC BOX (MB), le domaine de transactivation, le signal de localisation nucléaire (NLS), le domaine basique, le domaine Helix-Loop-Helix et le domaine Leucine zipper. Les deux sites d'initiation de la traduction sont également représentés. Les lignes horizontales indiquent la longueur et la composition des deux protéines MYC. (modifié d'après Meyer and Penn, 2008).

Le facteur de transcription MYC est organisé en trois domaines :

- ✓ Un domaine d'activation de la transcription (TAD) dans sa partie amino-terminale contenant deux régions très conservées appelées MYC Box I ou MBI (résidus 47 à 62) et MYC Box II ou MBII (résidus 128 à 143). Ce dernier correspond au domaine d'interaction avec TRRAP (*Transactivation/transcription domain associated protein*) et d'autres protéines essentielles pour la régulation transcriptionnelle. Ce domaine MBII est essentiel à l'effet transformant de MYC (Conzen *et al.*, 2000).
- ✓ Une région centrale qui contient une séquence de localisation nucléaire (résidus 320 à 328) ainsi que trois autres MYC Box : MBIII a (résidus 188 à 199) impliqué dans la transformation cellulaire, MBIIIb (résidus 259 à 270) 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 carboxy-terminal qui comprend une région basique (résidus 355 à 368) impliquée dans la reconnaissance et la liaison à des séquences spécifiques d'ADN, un motif *Helix-Loop-Helix* (HLH, résidus 368 à 410) et un motif *Leucine-Zipper* (résidus 411 à 439) responsables de la formation d'hétérodimères entre MYC et MAX (Ryan and Birnie, 1996 ; Facchini and Penn, 1998 ; Meyer and Penn, 2008).

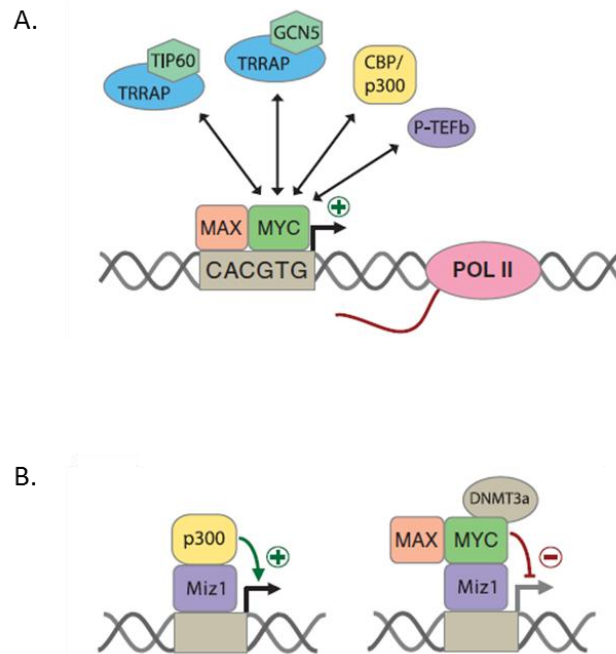
### 3. Activité de MYC

La protéine MYC est un facteur de transcription dont la liaison à l'ADN au niveau des régions promotrices de ses gènes cibles nécessite l'interaction avec un partenaire de dimérisation : MAX (*MYC Associated Factor X*). MAX est une petite protéine de 18kDa contenant

un domaine *Helix-Loop-Helix* et un motif *leucine zipper* (Blackwood and Eisenman, 1991). Les séquences d'ADN préférentiellement reconnues par les hétérodimères MYC/MAX sont les séquences consensus CACGTG ou CATGTG appelées E-box (Blackwell *et al.*, 1993).

MYC peut agir comme aussi bien comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel (Figure 25). Le complexe MYC/MAX peut induire la transcription de ses gènes cibles par le recrutement de coactivateurs tels que des histones acétyltransférases qui remodelent la chromatine. Ainsi, MYC interagit directement avec p300 (CBP pour *CREB Binding Protein*) alors que sa liaison avec les histone-acétyltransférases TIP60 (*TAT-Interactive Protein*) et GCN5 (*General Control of amino-acid synthesis 5*) fait intervenir la protéine adaptatrice TRRAP. Un autre mécanisme d'induction de la transcription des gènes cibles implique la liaison de MYC à des facteurs d'élongation de la transcription tels que P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor*) qui phosphoryle le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II (Kanazawa *et al.*, 2003 ; Gargano *et al.*, 2007).

Le facteur MYC agit également comme un répresseur transcriptionnel mais les mécanismes d'action sont moins bien connus. Les hétérodimères MYC/MAX interagissent avec des activateurs transcriptionnels liés à l'ADN tels que NFY (*Nuclear transcription Factor Y*), SP1 (*Specific Protein 1*) et MIZ1 (*MYC Interacting Zinc finger protein*) (Kleine-Kohlbrecher *et al.*, 2006). Par le biais de cette interaction, MYC empêcherait le coactivateur p300 de s'associer à MIZ1 et conduirait au recrutement de corépresseurs transcriptionnels tels que l'ADN méthyltransférase DNMT3a (Brenner *et al.*, 2005).



**Figure 25 : L'activité MYC.**

A. Activation transcriptionnelle du complexe MYC/MAX et des partenaires coopératifs. MYC recrute des histones acétyltransférases pour remodeler la chromatine : MYC interagit directement avec p300 alors que la liaison avec TIP60 (TAT-interactive protein 60) et GCN5 (General Control of amino-acid synthesis 5) fait intervenir la protéine adaptatrice TRRAP (Transformation/Transcription domain Associated Protein). Un autre mécanisme d'induction de la transcription des gènes cibles implique la liaison de facteurs d'élongation de la transcription tels que P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Factor b).

B. Répression transcriptionnelle par le complexe MYC/MAX (MYC-Associated factor X). Le complexe MYC/MAX peut interagir avec MIZ1 (MYC-Interacting Zinc finger protein 1), empêchant alors ce dernier de se lier à p300. L'association de MYC/MAX/MIZ1 conduit au recrutement d'une ADN méthyltransférase (DNMT3a) induisant la répression de la transcription au niveau des promoteurs cibles de Miz-1. (modifié d'après Klapproth and Wirth, 2010).

CBP : CREB-Binding Protein

#### 4. Régulation de l'expression et de l'activité de MYC

Dans les cellules normales, l'expression de MYC est finement régulée à plusieurs niveaux (transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel) afin de permettre une expression rapide et efficace pouvant être modulée suite à des signaux internes ou externes.

Le locus *MYC* est bordé par deux régions d'attachement à la matrice (MAR pour *Matrix Attachment Regions*) qui séparent le gène *MYC* des gènes voisins. Le gène *MYC* se trouve dans une région d'euchromatine caractérisée par une hyperacétylation des histones H3 et H4 ainsi que par la perte de la méthylation K9 de l'histone H3. En amont du gène *MYC*, les régions d'euchromatine et d'hétérochromatine sont séparées par l'insulateur : MINE (*MYC INSulator Element*). Ce dernier est composé d'un élément de barrière (BE pour *Barrier Element*) et d'un site de fixation au répresseur transcriptionnel CTCF (*CCCTC-binding Factor*). Le facteur CTCF agit donc comme un répresseur de la transcription du gène *MYC*. Dans les cancers du poumon et de

la prostate, des mutations de CTCF empêchent sa fixation au niveau du promoteur de *MYC* (pour revue : Wierstra and Alves, 2008).

Le locus *MYC* est également hyperméthylé et silencieux dans des lignées de cellules leucémiques induites pour leur différenciation telles que les cellules leucémiques humaines K562. Au contraire le gène *MYC* est hypométhylé et surexprimé dans des carcinomes hépatiques ou encore dans des cancers gastriques (Tsujiuchi *et al.*, 1999 ; Fang *et al.*, 2004 ; pour revue : Wierstra and Alves, 2008). Une étude portant sur le statut de méthylation du locus *MYC* chez trente-neuf patients atteints de LLC ou de leucémie prolymphocytaire B (PLL pour *ProLymphocytic Leukemia*) a révélé une hypométhylation de *MYC* dans seulement quatre cas, démontrant que l'hypométhylation du locus *MYC* est peu fréquente dans ces cancers B (Crossen and Morrison, 1999).

La protéine *MYC* est également capable de réprimer ses propres promoteurs. Cette autorégulation nécessite la formation d'hétérodimères entre *MYC* et son partenaire *MAX*. Cependant les complexes *MYC/MAX* ne se fixent pas sur des séquences E-box puisque le promoteur de *MYC* n'en contient pas (Facchini *et al.*, 1997). *MYC* réprime son promoteur P2 via un mécanisme impliquant les éléments initiateurs *Inr* et le site de fixation à E2F (*E2 promotor binding Factor*). Le facteur p107, capable de lier à la fois *MYC* et E2F, intervient également dans la répression de P2 contrairement aux protéines pRb et p130 (Luo *et al.*, 2004).

D'autres données bibliographiques indiquent que *MYC* est aussi capable de réprimer le promoteur P1 (Lucas *et al.*, 1993).

Cette boucle d'autorégulation négative est un mécanisme de contrôle crucial qui protège la cellule de l'effet transformant de *MYC*. La perte de cette autosuppression est observée dans plusieurs lignées tumorales et constitue donc l'un des mécanismes contribuant à l'activation oncogénique de *MYC* (Grignani *et al.*, 1990 ; Facchini *et al.*, 1997 ; pour revue : Wierstra and Alves, 2008).

L'activité des promoteurs de *MYC* est contrôlée par de nombreuses voies de signalisation, déclenchées en réponse à des cytokines [IL-1, IL-6, IFN $\gamma$  (*Interferon gamma*) TNF (*Tumor Necrosis Factor*), et TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*)], des facteurs de croissance [EGF (*Epidermal Growth Factor*) et PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)], ou encore à des hormones (œstrogènes, hormones thyroïdiennes, et érythropoïétine). Les facteurs de transcription activés par ces différentes voies de signalisation peuvent se fixer au niveau des

promoteurs du gène *MYC* pour induire ou réprimer sa transcription (pour revue : Wierstra and Alves, 2008).

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont capables de se fixer sur les promoteurs du gène *MYC*. Leur site de fixation contient un motif CpG dont la méthylation empêche la fixation d'E2F1 sans affecter celle d'E2F2, E2F3, E2F4 et E2F5 (Albert *et al.*, 2001). Parmi les régulateurs positifs de l'expression de *MYC*, on retrouve également le facteur STAT3, la protéine FBP (*Fuse Binding Protein*), les dimères RelB/p52, RelA/p50 de la voie NF- $\kappa$ B et le facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein 1*) (Barré *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2000 ; La Rosa *et al.*, 1994 ; Toualbi *et al.*, 2007). En revanche, les facteurs STAT1, BLIMP1 (*B lymphocyte induced maturation protein 1*), P53, C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha*) ou encore les dimères p50/p50 font partie des régulateurs négatifs de *MYC* (Johansen *et al.*, 2001 ; Györy *et al.*, 2003).

Au niveau post-traductionnel, la régulation de l'activité de la protéine *MYC* peut être contrôlée par des mécanismes directs ou indirects incluant des phosphorylations, glycosylations, ubiquitinations ou des interactions avec d'autres protéines.

Le facteur *MYC* peut être phosphorylé sur quinze sites Sérine ou Thréonine. Les deux phosphorylations les plus pertinentes ont lieu sur deux sites hautement conservés au niveau du domaine d'activation de la transcription (TAD) amino-terminal, à savoir la thréonine 58 (T58) et la sérine 62 (S62) (Facchini and Penn, 1998). La phosphorylation S62 augmente la stabilité de la protéine *MYC* tandis que celle en T58 conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de *MYC* par le complexe SCF<sup>Fbw7</sup> (*Skp1-cullin-1-F-box complex that contains FBW7*) (Welcker *et al.*, 2004 ; Yada *et al.*, 2004). Des mutations sur ces deux sites ont été décrites dans des cas de lymphome de Burkitt entraînant une augmentation de la stabilité de la protéine *MYC* (Salghetti *et al.*, 1999 ; Bahram *et al.*, 2000). En effet, des mutations au niveau de la thréonine 58 favorise le pouvoir transformant de *MYC* et sont fréquemment retrouvées dans le lymphome de Burkitt (Chou *et al.*, 1995). La dégradation de *MYC* est également induite par l'enzyme GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase*). Cette kinase est responsable de la phosphorylation en T58 permettant le recrutement de PIN1 qui catalyse l'isomérisation cis-trans en proline 63. Ce changement de conformation va faciliter le recrutement de la phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) qui va déphosphoryler la sérine 62. La déphosphorylation du site S62 permet le recrutement de l'ubiquitine ligase Fbw7 (Yeh *et al.*, 2004). Deux ubiquitine ligases supplémentaires sont impliquées dans la régulation de l'activité de *MYC* : SKP2 et HECTH9 (Kim *et al.*, 2003 ; Adhikary *et al.*, 2005).

Il a également été montré que la protéine MYC pouvait être glycosylée au niveau de sites localisés dans le domaine TAD ainsi que sur le résidu thréonine 58. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une glycosylation de type O avec le N-acétylglucosamine comme motif sucré permettant de moduler l'activité de MYC.

## 5. Fonctions des gènes cibles de MYC

En réponse à des signaux de l'environnement, MYC est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la progression dans le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la différenciation, ou encore l'apoptose. Le facteur MYC apparaît donc comme une protéine multifonctionnelle. La dérégulation de MYC participe donc à la genèse d'un large spectre de tumeurs.

### 5.1 Cycle cellulaire, croissance et prolifération

L'une des fonctions biologiques clé du facteur MYC est de favoriser la progression dans le cycle cellulaire (Oster *et al.*, 2002 ; Dang *et al.*, 2006 ; Meyer and Penn, 2008) (Figure 26).

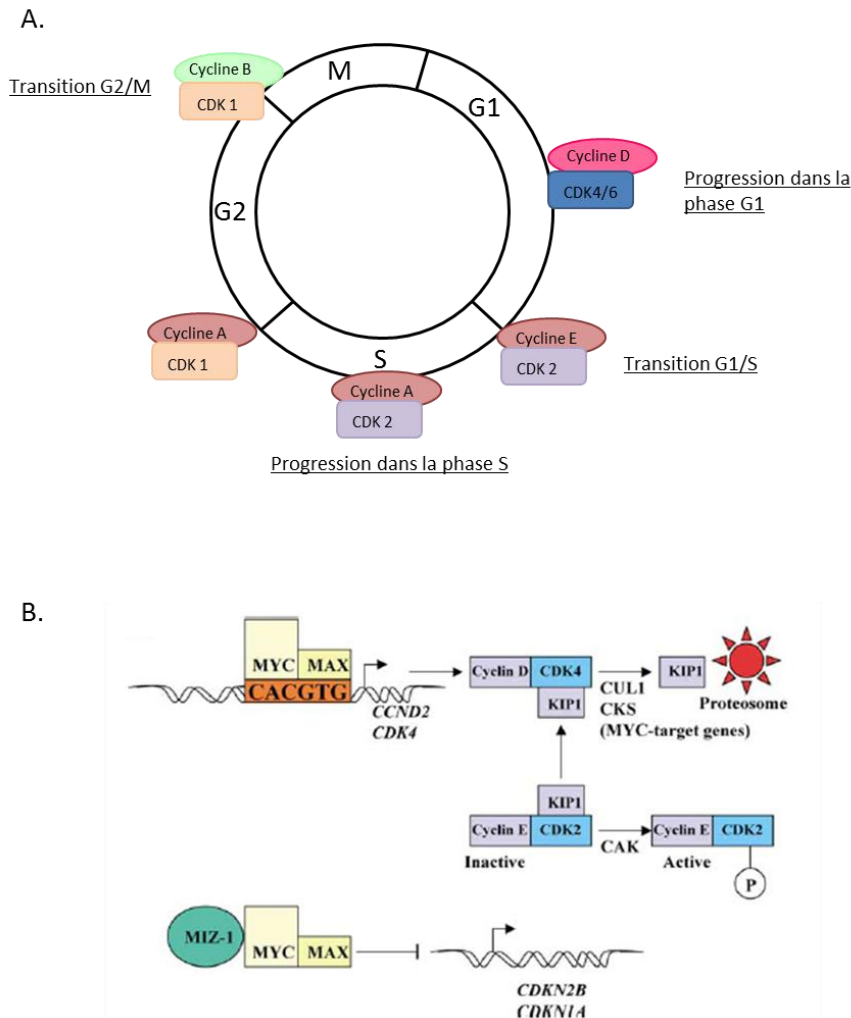
Suite à une stimulation mitogénique, les niveaux du transcrit et de la protéine MYC sont augmentés de manière rapide et transitoire. MYC est essentiel à la transition entre les phases G0/G1 et la phase S en régulant l'expression de nombreux gènes codant les cyclines D1, D2, E1 et A2, ainsi que les gènes codant CDK4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*), E2F1 et E2F2.

L'expression de la cycline D2 et de CDK4 permet la séquestration de l'inhibiteur des CDK p27<sup>KIP1</sup> au sein du complexe « cycline D2-CDK4 ». La dégradation de p27<sup>KIP1</sup> qui en résulte met en jeu deux autres cibles de MYC : CUL-1 (*Cullin 1*) et CKS (*Cyclin-dependent Kinases regulatory Subunit*). La dégradation de p27<sup>KIP1</sup> libère les complexes « cycline E-CDK2 » qui vont alors phosphoryler pRb et libérer par là même les facteurs E2F. Ces facteurs permettent alors l'entrée en phase S de la cellule.

Les hétérodimères MYC/MAX sont également impliqués dans la répression de la transcription de gènes tels que *GADD45* (*Growth arrest and DNA-damage inducible 45*) et *GADD153* qui codent des inhibiteurs impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire. MYC intervient aussi dans la répression d'inhibiteurs des CDK tels que p15 et p21 impliqués



dans l'arrêt du cycle cellulaire. Cette répression par MYC se fait par son interaction avec le facteur transcriptionnel MIZ1 (Staller *et al.*, 2001).



**Figure 26 : Le cycle cellulaire.**

A. Les différentes étapes du cycle cellulaire sont contrôlées par des complexes protéiques associant une kinase (CDK pour Cycline Dependent Kinase) à une sous-unité régulatrice (cycline). Différents complexes Cyclines/CDK interviennent tout au long du cycle cellulaire.

B. MYC favorise la progression G1/S: les hétérodimères MYC/MAX (MYC Associated factor X) activent la transcription de gènes cibles tels que les gènes codant la cycline D2 et la CDK4. La dégradation de KIP1 (p27), un inhibiteur des CDK, implique deux cibles de MYC: CUL-1 (Cullin 1) et CKS (Cyclin-dependent Kinase regulatory Subunit). Les hétérodimères MYC/MAX, grâce à une interaction avec Miz-1, répriment la transcription des gènes codant p15 (CDKN2B) et p21 (CDKN1A) impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. (modifié d'après Pelengaris *et al.*, 2003)

MYC est capable d'augmenter le pouvoir prolifératif des cellules en favorisant la croissance cellulaire. Cette dernière se définit par une augmentation de la masse ou de la taille d'une cellule. La capacité de MYC à promouvoir la croissance cellulaire a été montrée aussi bien dans des cellules normales que des cellules tumorales, et aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Des cellules B murines exprimant le transgène Eμ-MYC présentent une augmentation de leur taille,

caractéristique retrouvée à tous les stades de la différenciation B *in vitro* (Iritani and Eisenman, 1999). MYC permet la croissance cellulaire en fournissant à la cellule une réserve de constituants de base, en augmentant son métabolisme ainsi que sa synthèse protéique. En effet, MYC augmente l'activité des ARN polymérase I et III, et par conséquent la biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique (Gomez-Roman *et al.*, 2003). C'est en se fixant au facteur TFIIIB (*Transcription Factor III B*) que MYC augmente l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase III (Gomez-Roman *et al.*, 2003).

## 5.2 Métabolisme

MYC est impliquée dans la régulation de nombreuses voies du métabolisme cellulaire. Il favorise la glycolyse *via* une augmentation du transport intracellulaire de glucose et la régulation de bon nombre d'enzymes clés du métabolisme du glucose (Kim *et al.*, 2004). Parmi ces enzymes, on peut citer l'hexokinase II et la lactate déshydrogénase A (LDHA) qui entraînent une production de lactate à partir du pyruvate émis par la glycolyse. Ce phénomène, appelé effet Warburg, est caractéristique de nombreuses tumeurs (Vander Heiden *et al.*, 2009). Dans la tumeur, le passage de la respiration oxydative à la glycolyse anaérobie a de nombreuses conséquences qui vont au-delà de l'aspect purement énergétique. En effet, plusieurs dérivés du métabolite glycolytique favorisent la prolifération, tels que le ribose-6-phosphate qui entre dans la composition des acides aminés. Ainsi, MYC favorise la capacité de la cellule à proliférer en condition hypoxique en augmentant la glycolyse.

MYC est également un régulateur positif de gènes impliqués dans la biogenèse de la mitochondrie. Il stimule l'expression de la glutaminase mitochondriale par l'inhibition du micro-ARN 23a/b (Gao *et al.*, 2009).

Le métabolisme du fer est également affecté par MYC : la ferritine, IRP1 (*Iron Regulatory Protein 1*), IRP2 et le récepteur à la transferrine constituent des cibles de MYC (Wu *et al.*, 1999).

Des enzymes nécessaires à la synthèse nucléotidique sont elles aussi régulées par MYC : il s'agit de l'ornithine décarboxylase, la carbamoyl phosphate synthase et de l'aspartate transcarbamylase (Dang *et al.*, 2006).

### 5.3 Différenciation et pluripotentialité

Le rôle de MYC dans la différenciation a été proposé pour la première fois en 1997 par A. Gandarillas : l'expression constitutive de MYC dans des cellules souches de kératinocytes conduit à une diminution progressive de la prolifération et à leur différenciation (Gandarillas and Watt, 1997). Au contraire, MYC, en collaboration avec des facteurs présents dans les cellules souches [Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) et Sox2 (*SRY-box 2*)], peut convertir des fibroblastes murins et humains en cellules souches pluripotentes ressemblant à des cellules souches embryonnaires classiques (Takahashi *et al.*, 2007). En 2007, l'équipe de B. Iritani, a montré que le rôle de MYC est dépendant de l'état de différenciation de la cellule : l'expression de MYC dans les progéniteurs lymphoïdes B permet leur différenciation, alors que son expression dans les cellules B post-médullaires inhibe leur différenciation terminale (Murphy *et al.*, 2005 ; Habib *et al.*, 2007). L'induction de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et épidermiques par MYC fait intervenir la régulation de l'expression de molécules d'adhésion (Murphy *et al.*, 2005). Un travail récent montre qu'au sein de la tumeur, MYC participerait au maintien des cellules souches cancéreuses capables d'autorenouvellement (Shackleton *et al.*, 2009).

### 5.4 Angiogenèse

MYC favorise l'angiogenèse, processus essentiel au développement tumoral permettant de lutter contre l'hypoxie. L'activation de MYC dans des fibroblastes de rat est accompagnée par une diminution de l'expression de la thrombospondine-1 qui est un régulateur négatif de l'angiogenèse (Janz *et al.*, 2000). Le mécanisme impliqué dans la régulation négative de la thrombospondine-1 par MYC pourrait faire intervenir le cluster de micro-ARN miR-17-92 (Dews *et al.*, 2006). Pelengaris et Evan ont montré que la surexpression de MYC dans des cellules pancréatiques est cruciale pour initier l'angiogenèse (Pelengaris *et al.*, 2002b).

Egalement, des études ont montré que MYC induit la production et la sécrétion de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dans le myélome multiple (Podar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Au contraire dans des cellules du cancer du poumon, la surexpression de MYC s'accompagne d'une répression du facteur VEGF (Barr *et al.*, 2000). L'ensemble de ces données suggère que le rôle de MYC dans l'angiogenèse serait dépendant du microenvironnement tumoral.

### 5.5 Instabilité génomique

L'instabilité génomique est la marque de nombreux cancers. Des travaux ont montré que MYC peut promouvoir l'instabilité chromosomique (Mai *et al.*, 1996 ; Felsher and Bishop, 1999). MYC pourrait intervenir dans le processus d'instabilité génomique via la production d'espèces réactives oxygénées, l'altération de la structure des chromosomes (Prochownik and Li, 2007) et/ou l'abrogation des points de contrôle au niveau des phases G1 et S du cycle cellulaire (Dang *et al.*, 2005 ; Prochownik and Li, 2007).

### 5.6 MicroARN induits par MYC

Les microARN correspondent à des petits ARN simple-brin non codants de 20-24 nucléotides impliqués dans la stabilité et l'efficacité traductionnelle d'ARN messagers cibles. La complexité des fonctions modulées par MYC est devenue croissante avec la découverte de la régulation de certains microARN par MYC (Sander *et al.*, 2009).

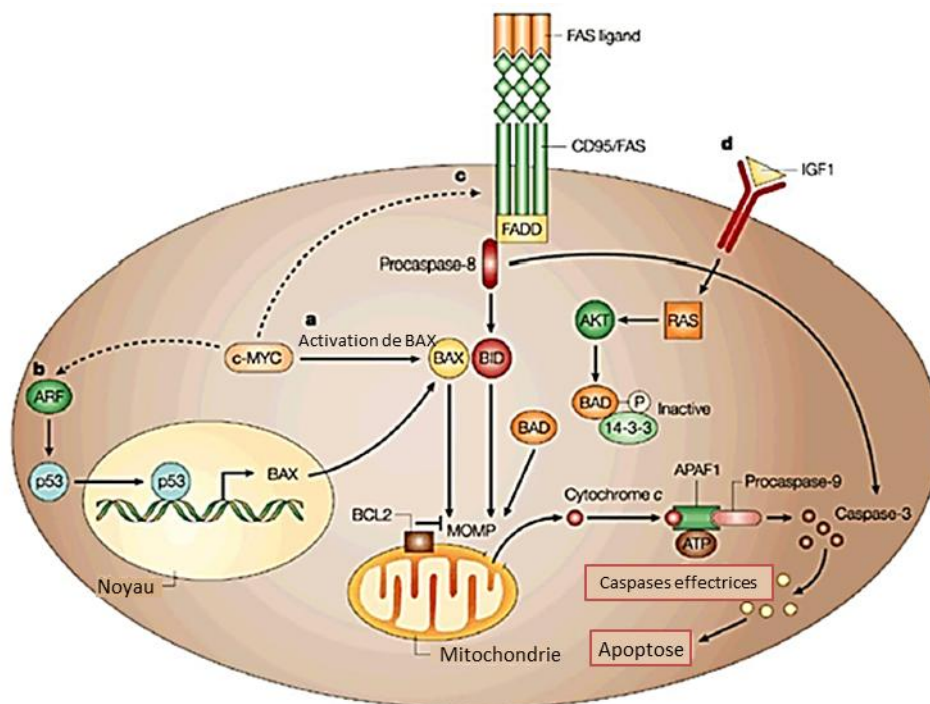
En 2005, deux équipes ont décrit l'augmentation de l'expression de plusieurs microARN regroupés dans un cluster appelé miR-17-92 ou oncomir-1 (He *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2005). L'expression de ce cluster augmente la prolifération des cellules lymphomateuses *in vivo* (He *et al.*, 2005). Les microARN miR-17-5p et miR-20a issus de ce cluster diminuent l'expression du facteur pro-apoptotique E2F1, lui-même cible de MYC (O'Donnell *et al.*, 2005). Le cluster miR-17-92 inhibe aussi les suppresseurs de tumeur TP53, PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog* ; inhibiteur de la voie PI3K/AKT) et BIM/BCL2L11 (*BCL2 Interacting Mediator of cell death*) dans des lignées de lymphome de Burkitt (Ventura *et al.*, 2008; Inomata *et al.*, 2009 ; Mu *et al.*, 2009; Olive *et al.*, 2009). Donc en ciblant le cluster miR-17-92, MYC inhibe son propre effet pro-apoptotique et par la même augmente son effet transformant.

D'autres microARN identifiés comme cibles de MYC sont réprimés par celui-ci tels que les miR-23a/b qui augmentent le métabolisme énergétique (*cf.* Paragraphe 5.2 de ce chapitre).

## 5.7 Apoptose

Paradoxalement, MYC est également impliqué dans la sensibilisation et l'induction de l'apoptose. En absence d'IL-3, des cellules hématopoïétiques surexprimant MYC entrent en apoptose (Askew *et al.*, 1991), de la même manière que des fibroblastes privés de sérum (Evan *et al.*, 1992). D'un point de vue évolutif, l'apoptose induite par MYC fournirait à la cellule un « mécanisme de sécurité » empêchant une prolifération cellulaire anarchique et l'émergence de cancers. Ainsi, les tumeurs présentant une dérégulation de l'expression de MYC sont associées à des mutations qui affectent le processus d'apoptose comme le lymphome de Burkitt.

MYC régule les différentes voies apoptotiques : les voies dépendantes ou indépendantes de P53, la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Figure 27).



**Figure 27 : Interaction de MYC avec les voies de signalisation apoptotiques.**

a. L'activation de la protéine BAX (BCL2 Associated X protein) par MYC conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et au relargage du cytochrome c qui va alors interagir avec APAF-1 (Apoptotic protease-activating Factor 1) et la procaspase 9. Ce complexe forme l'apoptosome.

b. Une autre voie impliquant MYC conduit également au relargage du cytochrome c : l'activation directe de P53 par MYC via ARF (Alternate Reading Frame).

c. La liaison de FAS ligand au récepteur FAS permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (FAS Associated Death Domain). Cette dernière va alors recruter la procaspase 8 conduisant à son autoactivation. La caspase 8 peut activer la protéine BID (BH3 Interacting Domain death agonist) capable de perméabiliser la membrane mitochondriale.

d. MYC est également capable de réprimer les signaux de survie initiés par la signalisation via le récepteur IGF1 (Insulin Growth Factor 1) qui permet la séquestration de Bad (BCL-XL/BCL2 Associated Death promotor). (modifié d'après Pelengaris *et al.*, 2002a).

AKT : AK Transforming ; MOMP : Mitochondrial Outer Membran Permeabilization

P53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à des signaux de stress. Un faible niveau de P53 est normalement maintenu dans la cellule grâce à MDM2, régulateur négatif de P53. Le suppresseur de tumeur ARF1 inhibe MDM2 avec pour conséquence l'activation de P53. MYC est impliqué dans l'activation de P53 *via* la régulation positive de ARF1 (Zindy *et al.*, 1998). L'augmentation de ARF1 par MYC est indirecte et implique l'activation du facteur de transcription FoxO (Bouchard *et al.*, 2007). Egalement, MYC affecte la stabilité du génome (*cf.* Paragraphe 5.5) conduisant à l'activation de la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated* ; régulateur de la réponse aux dommages à l'ADN activé par les cassures double-brin) qui va phosphoryler et stabiliser P53 (Banin *et al.*, 1998 ; Lindström and Wiman, 2003).

MYC promeut aussi l'apoptose médiée par la voie des récepteurs de mort tels que CD95L et TRAIL-R (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor*). Des travaux ont montré que, dans des fibroblastes embryonnaires, l'apoptose induite par MYC nécessite la liaison du ligand CD95L au récepteur CD95 (Hueber *et al.*, 1997). De plus, MYC réprime l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui protège de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Klefsch *et al.*, 1997). Notons également que MYC réduit l'expression de CFLAR (*CASP8 and FADD-like Apoptosis Regulator* ; inhibiteur de la Caspase 8) ce qui augmente l'activité de la Caspase 8 (Ricci *et al.*, 2004).

D'autres études ont montré que MYC intervient dans l'induction de l'apoptose mitochondriale en modulant l'expression des molécules pro et anti-apoptotiques de la famille BCL2. Dans le modèle de lymphomagenèse E $\mu$ -MYC, MYC inhibe l'expression des molécules anti-apoptotiques BCL2 et BCL-XL (Eischen *et al.*, 2001). L'expression de MYC est déterminante pour les changements conformationnels à l'origine de l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX (Soucie *et al.*, 2001). MYC participe aussi à la libération du cytochrome c en augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale ce qui conduit à l'activation des caspases effectrices (Iaccarino *et al.*, 2003). Enfin, l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM est induite par MYC (Egle *et al.*, 2004).

En résumé, MYC régule de nombreuses fonctions cellulaires dont les principales abordées ici sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau 2).

Fonction	Gènes	Référence
Prolifération et progression dans le cycle cellulaire	<i>CCND1, CCND2</i> <i>CDK4</i> <i>E2F1, E2F2</i> <i>CDKN1A, CDKN2B</i> <i>CUL1, CKS</i>	Pour revue Meyer and Penn, 2008 Zeller et al., 2006 Pelengaris et al., 2003
Métabolisme	<i>HK2</i> <i>LDHA, LDHB</i> <i>IRP1, IRP2</i> <i>PHGDH, PSAT, SHMT2</i> <i>FASN, SCD</i>	Kim et al., 2004 Wu et al., 1999 Nikiforov et al., 2002 Pour revue Dang, 2013
Angiogenèse	<i>THBS1, VEGF</i>	Janz et al., 2000 Barr et al., 2000
Apoptose	<i>ARF, ATM</i> <i>CFLAR</i> <i>BAX, BIM</i> <i>BCL2, BCL-XL</i>	Zindy et al., 1998 Banin et al., 1998 Ricci et al., 2004 Egle et al., 2004 Eischen et al., 2001
Biogenèse de la mitochondrie	<i>PGC1 β</i> <i>P32</i> <i>ARK5</i>	Morrish et al., 2003 Fogal et al., 2010 Pour revue Dang, 2013
Micro-ARN	<i>miR-17-92</i> <i>miR23a/b</i>	He et al., 2005 Gao et al., 2009

**Tableau 2:** Exemples de gènes cibles du facteur de transcription MYC et les fonctions cellulaires dans lesquels ils sont impliqués.

## 6. Coopération entre MYC et d'autres voies transformantes

Environ 70% des tumeurs humaines présentent une surexpression ou une dérégulation de MYC. Les altérations conduisant à la dérégulation de MYC incluent les translocations chromosomiques, des mutations, des amplifications géniques et/ou une augmentation de la stabilité de la protéine.

Comme nous venons de le voir au travers du Paragraphe 1.5, MYC est à la fois un régulateur transcriptionnel maître de la prolifération cellulaire et un puissant inducteur de l'apoptose probablement pour empêcher une prolifération cellulaire incontrôlée. Liée à cette ambivalence, l'émergence de tumeurs associées à MYC nécessite la coopération d'autres oncogènes ou voies oncogéniques, le plus souvent anti-apoptotiques.

En 1983, l'importance de la coopération d'oncogènes dans la transformation cellulaire induite par MYC a été mise en évidence dans un modèle de fibroblastes de rat où *MYC* coopère avec l'oncogène *RAS* (Land *et al.*, 1983). Depuis d'autres oncogènes qui coopèrent avec *MYC* ont été mis en évidence tels que la protéine anti-apoptotique *BCL2*. En effet, des souris double transgéniques  $E\mu$ -*BCL2*/*MYC* présentent une tumorigenèse accélérée par rapport à celle observée chez les animaux simple transgéniques puisque l'apoptose induite par *MYC* est supprimée par la surexpression de *BCL2* (Strasser *et al.*, 1990). La voie apoptotique *P53*/*MDM2*/*ARF* est aussi très souvent inactivée par mutation dans le lymphome de Burkitt (Lindström and Wiman, 2002 ; Wilda *et al.*, 2004).

Parmi les voies de signalisation qui coopèrent avec *MYC*, on trouve la voie *ERK*/*MAPK* qui participe à la stabilisation de *MYC* via la phosphorylation de sa sérine 62 (Gustafson and Weiss, 2010). Un autre exemple est celui de la voie *PI3K*/*AKT* qui inhibe la kinase *GSK-3 $\beta$* , impliquée dans la phosphorylation de *MYC* à l'origine de sa dégradation (Liang and Slingerland, 2003 ; Engelman, 2009).



#### IV. Le lymphome de Burkitt

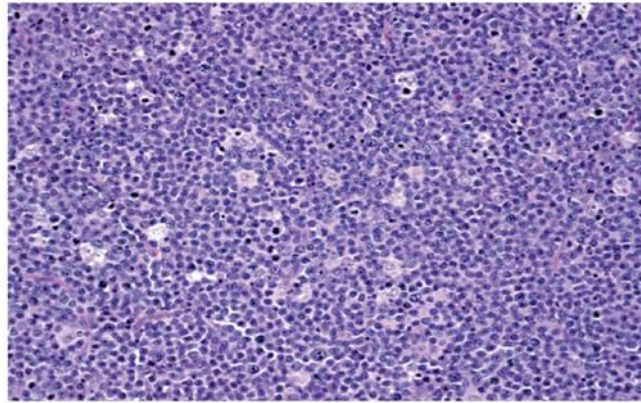
Dans ce chapitre, nous nous intéresserons en détail au lymphome de Burkitt, dont l'événement oncogénique primaire est la translocation du gène *MYC*, ainsi qu'aux co-facteurs impliqués dans la pathogenèse de cette maladie. Enfin nous présenterons les différents modèles murins qui permettent l'étude de cette pathologie.

##### 1. Présentation épidémiologique, histologique et immunophénotypique

Le lymphome de Burkitt est un lymphome agressif non-hodgkinien, décrit en 1958 par Denis Burkitt. Trois formes cliniques et épidémiologiques de lymphome de Burkitt sont décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Brady *et al.*, 2007) :

- ✓ La forme endémique est principalement retrouvée en Afrique équatoriale et en Papouasie-Nouvelle Guinée, dans des zones où la malaria est endémique ce qui lui doit son nom. Elle survient chez des enfants âgés de 4 à 7 ans. Cette forme de lymphome de Burkitt est associée à l'EBV dans plus de 95% des cas. D'un point de vue clinique, elle implique des tumeurs de la mâchoire et de la cavité abdominale (reins, ovaires et tractus gastro-intestinal).
- ✓ La forme sporadique décrite dans le reste du monde mais qui n'implique aucune répartition géographique ou climatique particulière. Cette forme représente 1 à 2% des lymphomes de l'adulte en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis. Elle est associée à l'EBV dans 15 à 20% des cas. La manifestation clinique de cette forme de lymphome de Burkitt se traduit par des tumeurs abdominales.
- ✓ La forme associée au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Cette forme est associée à l'EBV dans 30 à 40% des cas. Ici également les tumeurs sont abdominales.

Le lymphome de Burkitt est caractérisé par la présence de cellules tumorales rondes de taille variable, des noyaux ronds et contenant plusieurs nucléoles et par un index prolifératif très élevé, supérieur à 90% (évalué grâce au marqueur Ki-67). Un aspect de « ciel étoilé » a été décrit pour ce type de tumeur du fait de l'infiltration de nombreux macrophages, dispersés uniformément, qui prennent en charge les cellules apoptotiques (Figure 28).



**Figure 28 : Coupe histologique de lymphome de Burkitt.**

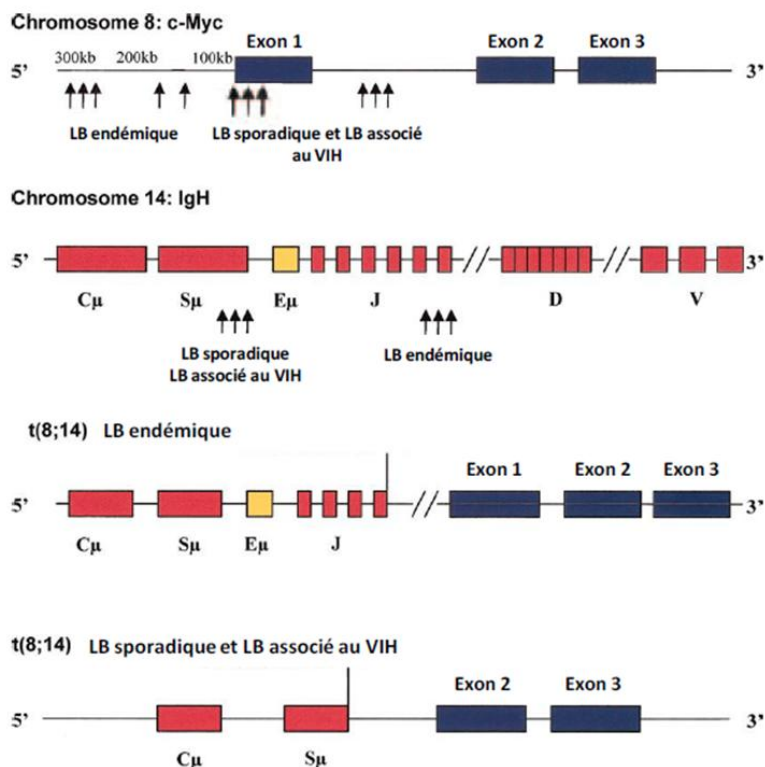
Représentation d'une coupe histologique du lymphome de Burkitt marquée avec de l'éosine et de l'hématoxyline illustrant l'aspect de ciel étoilé dû aux macrophages infiltrant la tumeur. (MoLYNeux et al., 2012).

Les cellules de lymphome de Burkitt expriment plusieurs marqueurs de différenciation tels que CD19, CD10, CD20, CD22, CD38, CD40 et CD79A. Elles expriment également le facteur BCL6. En revanche elles sont négatives pour l'expression du CD5, CD23, du facteur BCL2 et de l'enzyme TdT. La plupart des cellules expriment une IgM à leur surface mais l'expression d'une IgG a été observée dans certains cas (Gunvén *et al.*, 1980 ; Klein *et al.*, 1968). L'expression de BCL6 et de CD10 par les cellules de lymphome de Burkitt suggère qu'elles dérivent d'une cellule B du centre germinatif. L'analyse de séquences des gènes codant les régions variables des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines ont révélé la présence de mutations somatiques, ainsi qu'une diversité intra-clonale concernant ces mutations montrant l'origine centroblastique de la cellule tumorale du lymphome de Burkitt (Blum *et al.*, 2004).

## 2. Profil génétique du lymphome de Burkitt

La signature du lymphome de Burkitt est la surexpression de l'oncogène *MYC* du fait de sa translocation au niveau d'un des loci des gènes d'immunoglobulines. Dans 80% des cas, la translocation intervient entre les chromosomes 8 et 14 (t (8 ;14)) qui place alors le gène *MYC* dans le locus IgH. Dans 20% des cas *MYC* est transloqué dans le locus IgL, soit de la chaîne  $\kappa$  (t (2 ;8)), soit de la chaîne  $\lambda$  (t (8 ;22)). Ces différentes translocations sont à l'origine d'une surexpression systématique de *MYC*, considérée comme l'événement oncogénique primaire dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt (Magrath, 2012).

Plusieurs points de cassure ont été identifiés sur les chromosomes 8 et 14 en fonction du variant clinique de lymphome de Burkitt (Hecht and Aster, 2000 ; Blum *et al.*, 2004) (Figure 29).



**Figure 29 :** Localisation des points de cassure au niveau du gène *MYC* et sur le locus *IgH* lors du lymphome de Burkitt (LB). Les réarrangements obtenus dans le cas du LB endémique et dans les cas de LB sporadiques et de LB associés au VIH sont également représentés (modifié d'après Blum *et al.*, 2004).

Dans le lymphome de Burkitt endémique, le point de cassure sur le chromosome 8 a lieu au moins 100kb en amont du gène *MYC* et se produit au niveau de la région J du locus *IgH*. Cette translocation place les trois exons du gène *MYC* ainsi que ses promoteurs P1, P2 et P3 sous le contrôle de l'élément enhancer E $\mu$  au locus *IgH*. Dans les cas de lymphomes de Burkitt sporadiques ou associés au VIH, les points de cassure sont retrouvés entre l'exon 1 et l'exon 2 du gène *MYC* sur le chromosome 8 et à l'intérieur de la région switch S $\mu$  sur le chromosome 14. Seule la partie codante de *MYC* et le promoteur P3 sont conservés ; l'activateur E $\mu$  est éliminé lors de la translocation. La région régulatrice située en 3' du locus *IgH* (LCR3'*IgH* pour *Locus Region Control*) semble être impliquée dans la dérégulation de l'expression de *MYC* transloqué quel que soit le point de cassure. En effet, des travaux *in vitro* ont montré que la LCR 3'*IgH* induit un fort niveau d'expression de *MYC* et un changement de promoteur de P1 vers P2 tel que

observé pour les tumeurs de Burkitt de type endémique (Madisen and Groudine, 1994). La détermination des sites spécifiques requis pour la dérégulation de l'expression de *MYC* a permis d'identifier un site NF- $\kappa$ B présent dans l'activateur hs4 du locus IgH et nécessaire au changement de promoteur (Kanda *et al.*, 2000).

Comme évoqué précédemment, les cellules B sont la cible des réarrangements V(D)J, des processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe qui induisent des dommages à l'ADN programmés (*cf.* Chapitre I). Dans les tumeurs de lymphome de Burkitt, l'analyse des séquences de part et d'autre des points de cassure dans les régions VDJ et VJ montre qu'elles sont très certainement générées dans les centres germinatifs par le mécanisme d'hypermutation somatique plutôt que dans la moelle osseuse lors de la recombinaison V(D)J (Goossens *et al.*, 1998). De plus, les travaux du groupe de Nussensweig ont montré l'implication d'AID dans l'acquisition de la translocation *IgH-MYC in vivo* en provoquant des lésions et des mutations multiples au locus *MYC* (Ramiro *et al.*, 2004 ; Robbiani *et al.*, 2008). Dans les tumeurs humaines de Burkitt, le gène *MYC* transloqué présente de nombreuses altérations générées par le mécanisme de l'hypermutation somatique telles que des mutations ponctuelles et des délétions dont la plupart ont lieu à proximité des promoteurs P1 et P2 dans l'exon 1 et à la jonction exon1-intron1 (Rabbitts *et al.*, 1984 ; Bemark and Neuberger, 2000).

### 3. Altérations géniques additionnelles

La translocation de *MYC* implique une expression constitutive de l'ARN et une accumulation de la protéine entraînant la croissance cellulaire, la prolifération mais également l'apoptose. Dans des cellules normales, une telle surexpression de *MYC* conduirait au déclenchement de voies apoptotiques dépendantes ou non de P53. Dans le lymphome de Burkitt, la translocation de *MYC* s'accompagne donc d'autres dérégulations inhibant le processus d'apoptose.

Environ un tiers des cas de lymphome de Burkitt présentent des mutations inactivatrices et/ou des délétions de *TP53* (Farrell *et al.*, 1991). D'autres altérations affectant l'axe ARF1-MDM2-TP53 sont également décrites telles que des délétions de ARF1 ou des amplifications de MDM2 (Lindström *et al.*, 2001). La perte de fonction de P53 peut contribuer à l'instabilité génomique, et donc favoriser l'apparition de lésions génétiques additionnelles qui promeuvent le développement du lymphome.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, une des voies apoptotiques activée par MYC est la voie impliquant le facteur pro-apoptotique BIM. Dans le modèle murin E $\mu$ -MYC, la perte d'un seul allèle du gène *BIM* augmente l'incidence des lymphomes B (Egle et al., 2004). Dans le lymphome de Burkitt, l'expression de BIM est restreinte grâce à la méthylation de son promoteur (Mestre-Escorihuela *et al.*, 2007). De plus, des mutations dans le domaine de transactivation de MYC (P57S et T58A) sont fréquemment retrouvées dans le lymphome de Burkitt. Ces mutants de MYC ont perdu la capacité d'activer BIM (Chang *et al.*, 2000 ; Hemann *et al.*, 2005).

MYC est également capable de réduire l'immunogénicité des cellules tumorales. Le groupe de GW Bornkamm a montré que la sur-expression de MYC dans un modèle cellulaire B empêche la présentation d'antigène via le CMH de classe I et diminue la réponse aux interférons (Staege *et al.*, 2002 ; Schlee *et al.*, 2007a).

#### 4. Co-facteurs impliqués dans le lymphome de Burkitt

##### 4.1 Rôle de l'EBV

Malgré la découverte de l'EBV au sein de lignées établies à partir de biopsies de lymphomes de Burkitt et bien que l'EBV soit impliqué dans le développement de lymphoproliférations B humaines, le rôle de l'EBV dans la genèse du lymphome de Burkitt n'est pas clairement démontré.

L'infection par l'EBV n'est pas associée à tous les cas de lymphomes de Burkitt contrairement à la translocation de *MYC*, ce qui suggère que ce virus jouerait le rôle de cofacteur pour le développement de cette pathologie. Mais toutes les cellules tumorales sont infectées par le virus dans les lymphomes de Burkitt associés à l'EBV (Carbone *et al.*, 2008). En utilisant un épisode synthétique neutre comportant les séquences de fixation à EBNA1, Nanbo et al ont montré que la présence de l'épisode EBV doit résulter d'un processus de sélection positif. En effet, si l'épisode était neutre pour la cellule, celui-ci serait perdu pour moitié en huit divisions et complètement en cinquante divisions (Nanbo *et al.*, 2007). Néanmoins, en transfectant les cellules avec un dominant négatif d'EBNA1, le même groupe a démontré que les lignées de lymphomes de Burkitt dérivées de tumeurs Burkitt associées à l'EBV et mutées pour *TP53*

pouvaient perdre le virus sans conséquence pour la croissance cellulaire (Vereide and Sugden, 2011).

Lorsque l'EBV est associé au lymphome de Burkitt, les gènes transformants de l'EBV tels que LMP1 ne sont pas exprimés et ne contribuent donc pas à la prolifération tumorale. Dans ce lymphome, l'EBV exprime soit son programme de latence I où seule la protéine virale EBNA1 est exprimée en plus des deux ARN EBER et BART, soit des latences atypiques sans expression des protéines LMP. Le rôle potentiel d'EBNA1 a été évoqué dans la partie relative à cette protéine (*cf.* Chapitre II, paragraphe 3.1).

Les gènes viraux codant les ARN EBER et BART sont fortement exprimés dans les tumeurs du lymphome de Burkitt, en faisant alors des oncogènes potentiels. La transfection des gènes codant les EBER dans une lignée de lymphome de Burkitt EBV-négative augmente leur résistance à l'apoptose, leur tumorigénécité chez des souris SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) et leur capacité de croissance en agar mou (Komano *et al.*, 1999). De plus, les travaux de Niller ont mis en évidence un site de fixation à MYC au niveau du promoteur du gène codant EBER1 (Niller *et al.*, 2003 ; Niller *et al.*, 2004). Le groupe de K. Takada a revisité le rôle des EBER dans l'immortalisation des lymphocytes B et a montré que l'EBER2, mais non l'EBER1, rendait cette immortalisation cent fois plus efficace (Wu *et al.*, 2007).

Le groupe de Zachary L. Pratt montre une intéressante corrélation entre le niveau d'expression des micro-ARN et le maintien du génome de l'EBV dans des lignées de lymphome de Burkitt (Pratt *et al.*, 2009). Ce travail suggère que ces micro-ARN pourraient favoriser la survie des cellules de lymphome de Burkitt infectées par l'EBV *in vitro* et potentiellement *in vivo*. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II, le micro-ARN mir-BART5 réprime l'expression de la protéine pro-apoptotique PUMA (*P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*) (Choy *et al.*, 2008).

Comme évoqué dans le paragraphe 7 du Chapitre II, la latence III de l'EBV pourrait jouer un rôle dans la genèse du lymphome de Burkitt. En 2008, Thorley-Lawson et Allday proposent un modèle selon lequel l'effet anti-apoptotique des latences III et II de l'EBV pourrait favoriser l'émergence du lymphome de Burkitt (Thorley-Lawson and Gross, 2004). Parmi les protéines virales de la latence III, EBNA2 induit l'expression des protéines EBNA3A et EBNA3C qui inhibent l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM (Anderton *et al.*, 2008). La protéine LMP1 induit également des signaux de survie grâce à l'activation de NF- $\kappa$ B (Cahir-McFarland *et al.*, 2004).

LMP1 augmente aussi l'expression de l'enzyme AID (He et al., 2003). Ces travaux suggèrent qu'EBNA2 et LMP1 pourraient favoriser la survenue et le maintien d'une cellule avec la translocation MYC-IgH. Toutefois des travaux décrivent une incompatibilité entre les systèmes MYC et NF- $\kappa$ B dans le lymphome de Burkitt. En effet, l'induction de NF- $\kappa$ B dans un modèle de lymphomagenèse dépendante de MYC provoque l'apoptose des cellules tumorales (Klapproth et al., 2009). En réalité, à ce jour, il n'y a pas de données expérimentales quant au rôle de l'EBV aux étapes initiales de l'émergence du lymphome de Burkitt.

Des travaux ont montré que des lignées de lymphomes de Burkitt telles que la lignée Akata peuvent perdre spontanément l'EBV *in vitro* (Shimizu et al., 1994).

#### 4.2 Rôle de la stimulation et sélection antigénique *via* le BCR

Du fait de leur ressemblance phénotypique avec les cellules du centre germinatif et du fait de l'expression de marqueurs communs tels que BCL6 et le CD10, les cellules tumorales du lymphome de Burkitt semblent dériver de cellules du centre germinatif. En fait, l'origine de ces cellules n'est pas aussi claire et il pourrait même exister des origines différentes entre les cellules de lymphome de Burkitt endémique et celles de lymphome de Burkitt sporadique (Tamaru et al., 1995 ; Isobe et al., 2002). Une étude a comparé les séquences des gènes d'immunoglobulines entre les différentes formes cliniques de lymphome de Burkitt (endémique, sporadique et associée au VIH) afin de déterminer l'origine des cellules tumorales. Les résultats ont montré que les cellules tumorales de lymphomes de Burkitt endémiques et associés au VIH dérivent de cellules B sélectionnées pour l'antigène (cellules du centre germinatif ou post centre germinatif) tandis que les cellules tumorales de lymphome de Burkitt sporadique ne présentent pas de signes d'une sélection antigénique (« centroblastes précoces ») (Bellan et al., 2005). La différence entre BL endémique et BL associé au VIH d'une part et BL sporadique d'autre part est l'association à l'EBV. L'étude s'est donc également intéressée à la comparaison des séquences des gènes d'immunoglobulines entre des cas de BL EBV positifs et des cas de BL EBV négatifs. Les cellules tumorales de BL EBV positifs présentent de nombreuses mutations au niveau des régions variables des gènes codant les immunoglobulines contrairement aux cellules tumorales issues de BL EBV négatifs démontrant le rôle de la stimulation antigénique (Bellan et al., 2005).

#### 4.3 Rôle de la malaria

L'infection par *Plasmodium falciparum*, agent causal de la malaria, est un facteur de risque élevé dans le développement du lymphome de Burkitt. Elle touche plus de 90% des enfants de moins de cinq ans dans les zones d'endémie palustre en Afrique. L'activation polyclonale des cellules B, l'hyper-gammaglobulinémie et la production d'autoanticorps sont des caractéristiques de la malaria. L'infection par *Plasmodium falciparum* est connue pour avoir un effet immunosuppresseur et induire une tolérance immunitaire vis-à-vis du parasite lui-même mais aussi d'autres agents infectieux, ce qui pourrait favoriser la persistance de l'EBV dans l'organisme (Urban and Roberts, 2003). En effet la malaria est associée à une réponse anti-inflammatoire initiée par les cellules dendritiques, lesquelles deviennent tolérantes à la stimulation par les TLR aboutissant à un défaut d'activation des réponses immunes adaptatives (Perry *et al.*, 2005). Bien que le rôle immunosuppresseur de la malaria dans le développement du lymphome de Burkitt ne soit pas complètement élucidé, il permettrait à l'organisme de tolérer la prolifération des cellules B infectées par l'EBV et par la même l'acquisition de la translocation *IgH-MYC*.

La malaria pourrait avoir un rôle direct dans l'apparition des translocations chromosomiques associées au lymphome de Burkitt. En effet, *Plasmodium falciparum* stimule le TLR9, qui est capable d'induire l'expression de l'enzyme AID impliquée dans les phénomènes d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs (pour revue : Magrath, 2012). Notons que le génome de l'EBV stimule aussi le TLR9 (Ning, 2011) et pourrait ainsi également participer à cet effet.

#### 4.4 Rôle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Tout comme le parasite *Plasmodium falciparum*, le VIH constitue un facteur de risque important dans le développement du lymphome de Burkitt. La contribution précise du VIH dans le développement de cette pathologie demeure inconnue. L'immunosuppression liée à l'infection par le VIH conduit à une augmentation de la proportion de cellules B infectées par l'EBV circulant dans le sang (Bonnet *et al.*, 2006). La réponse immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par l'EBV. Le contexte d'immunodépression provoqué par le VIH, et notamment la perte d'une réponse T spécifique, intervient donc dans la pathogenèse des lymphoproliférations associées à l'EBV. De la même manière, la réponse immune normalement



initiée lors de la malaria est altérée par l'infection par le VIH résultant alors en une augmentation de la sévérité de cette pathologie (Flateau *et al.*, 2011).

## 5. Modélisation du lymphome de Burkitt chez la souris

La génération de modèles murins exprimant le gène *MYC* sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes d'immunoglobulines a débuté il y a plus de 25 ans avec l'établissement de souris transgéniques avec le gène *MYC* placé sous le contrôle de la séquence régulatrice  $E\mu$ . Ces souris développent des tumeurs B clonales (Adams *et al.*, 1985). La plupart des tumeurs présentent des mutations de la voie ARF-MDM2-P53 (Eischen *et al.*, 1999). Néanmoins, ce modèle reste relativement éloigné du lymphome de Burkitt puisque les cellules tumorales sont au stade pré-B et non au stade B mature.

Des souris portant un chromosome artificiel de levure contenant *MYC* et une partie du locus IgH humain (comprenant  $E\mu$ ) développent des lymphomes B (Bützler *et al.*, 1997). Toutefois, la délétion de  $E\mu$  entraîne également l'émergence de lymphomes (Palomo *et al.*, 1999).

Un modèle plus proche du lymphome de Burkitt a été obtenu grâce à la génération de souris où le gène *MYC* humain est placé sous le contrôle des séquences régulatrices du locus Ig $\lambda$ . Le transgène est exprimé spécifiquement dans les cellules B et entraîne le développement de lymphomes B matures avec un aspect de « ciel étoilé », caractéristique du lymphome de Burkitt (Kovalchuk *et al.*, 2000). C'est ce modèle murin de lymphome de Burkitt que nous avons utilisé lors de ma thèse.

L'insertion de *MYC* dans le segment constant  $C\alpha$  au locus IgH mime la translocation t(8 ;14) du lymphome de Burkitt en plaçant le gène *MYC* sous le contrôle de « l'enhancer » 3'IgH. Ces animaux développent des lymphomes avec une faible incidence (9,3%) (Cheung *et al.*, 2004).

L'insertion de *MYC* dans la région JH du locus IgH a permis de créer un modèle de lymphome de Burkitt endémique : 70% des animaux développent des lymphomes B matures (Park *et al.*, 2005a ; Park *et al.*, 2005b).

Au laboratoire, un modèle murin porteur d'un transgène *MYC-3'IgH LCR* a été généré : à partir de l'âge de douze semaines, 75% des animaux développent des tumeurs de type

lymphome de Burkitt et 25% développent des tumeurs apparentées à un phénotype de lymphome diffus anaplasique (Truffinet *et al.*, 2007). Mais avec le temps, ce modèle a dérivé et actuellement, moins de 50% des animaux développent des LNH B après 12 mois de vie (non publié).

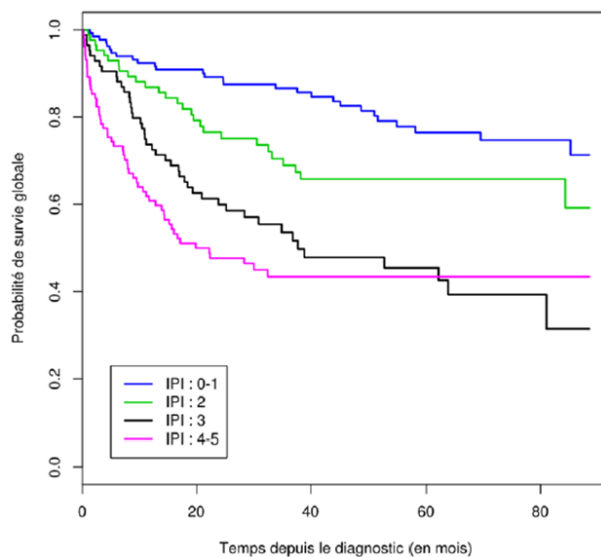
## V. Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

Cette partie d'introduction concerne les DLBCL (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*). Après une présentation générale de ces lymphomes, nous décrivons leur immunophénotype ainsi que les différents sous-groupes moléculaires de DLBCL communs existants. Enfin, cette partie se terminera par un paragraphe consacré aux thérapeutiques utilisées dans le traitement de ces lymphomes ainsi qu'aux nouvelles perspectives thérapeutiques.

### 1. Présentation générale

Parmi les lymphomes B agressifs, les DLBCL sont les plus fréquents, et représentent entre 30 et 40% des nouveaux cas de lymphomes diagnostiqués par an à travers le monde. Les DLBCL sont un groupe hétérogène de lymphomes. Selon la classification de l'OMS 2008, ils sont définis selon deux critères histopathologiques : une architecture diffuse du tissu ganglionnaire tumoral et la grande taille des cellules tumorales B matures estimée à environ trois fois la taille normale d'un lymphocyte B naïf. Les DLBCL peuvent soit survenir *de novo*, soit résulter de la transformation d'un lymphome indolent de faible grade de malignité tel que le lymphome folliculaire.

L'index pronostic international (IPI pour *International Prognostic Index*) est utilisé pour apprécier le pronostic des DLBCL communs afin de prévoir l'évolution de la maladie et de déterminer la stratégie thérapeutique à mettre en place. Il se base sur cinq facteurs pronostiques indépendants que sont l'âge, le stade tumoral, le taux sérique de LDH, l'état général du patient au moment du diagnostic et le nombre d'organes atteints. Le calcul de l'IPI se fait en additionnant le nombre de facteurs défavorables (de 0 à 5). Quatre groupes sont définis : faible risque (0 facteur), faible risque intermédiaire (1 facteur), haut risque intermédiaire (2 facteurs) et haut risque (3 facteurs et plus) (Shipp, 1994). Même si l'IPI reste l'index pronostique le plus utilisé pour les lymphomes agressifs et est d'application universelle y compris en Limousin (Figure 30), il présente des limites pour prédire la réponse au traitement individuellement.



**Figure 30 :** Courbe de survie globale des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) de la région Limousin selon l'IPI (International Prognostic Index) (période 2003-2010). (Penot, 2012).

La fréquence des DLBCL augmente chez les sujets immunodéprimés par exemple après une greffe d'organe ou lors de pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde. Les lymphomes sont alors très souvent associés à l'infection par l'EBV. Ce virus est associé à environ 5% des DLBCL du sujet immunocompétent (cf. Chapitre II, paragraphe 7). L'association à l'EBV augmente aussi avec l'âge, de ce fait 5 à 10% des DLBCL correspondent au sous-type « DLBCL EBV-positif du sujet âgé » de la classification WHO 2008.

Si à la fin des années 1990, les DLBCL étaient connus sous une seule catégorie, actuellement un nombre important de sous-types morphologiques et génétiques sont décrits, suggérant que les facteurs étiologiques associés à ces tumeurs sont probablement multiples et encore mal connus.

Selon la classification WHO 2008, les DLBCL se subdivisent en deux grands groupes : les lymphomes dits « communs » (NOS pour *Not Otherwise Specified*), et les entités spécifiques, comme les DLBCL riches en cellules T/histiocytes ou associés à l'EBV du sujet âgé (tableau 3).

DLBCL « communs » ( <i>Not Otherwise Specified</i> ou NOS)	Autres sous-types de DLBCL
Variants morphologiques: centroblastique immunoblastique anaplasique	Lymphome à grandes cellules riche en cellules T/histiocytes DLBCL primitif du système nerveux central DLBCL cutané primitif DLBCL EBV positif du sujet âgé
Sous-groupes moléculaires: type GCB ( <i>Germinal Center B Cell like</i> ) type ABC ( <i>Activated B Cell like</i> ) type III	Lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin DLBCL associé à une inflammation chronique Granulomatose lymphomatoïde Lymphome plasmablastique
Sous-types immunohistochimiques: LDGCB CD5+ GCB non-GCB	Lymphome à grandes cellules B ALK positif Lymphome à grandes cellules B associé à la maladie de Castleman multicentrique HHV-8 positif Lymphome diffus des séreuses

**Tableau 3 : Différents variants et sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).**

D'après « *Non-Hodgkin Lymphomas, second edition* » de James O. Armitage, Peter M. Mauch, Nancy Lee Harris, Bertrand Coiffier, Riccardo Dalla-Favera.

Dans les années 2000, les études du profil d'expression génique du groupe de Louis Staudt basées sur l'utilisation de micro-puces à ADNc ont initialement distingué deux principaux groupes pronostiques moléculaires de DLBCL : *germinal center B-cell-like* (GCB) et *activated B-cell-like* (ABC) caractérisés par des « signatures transcriptomiques » différentes indiquant des stades de différenciation B différents (Alizadeh *et al.*, 2000). Puis un troisième groupe a été caractérisé : les DLBCL de type III caractérisé par un profil d'expression génique intermédiaire (Rosenwald *et al.*, 2002). Les DLBCL appartenant à ce sous-groupe n'expriment pas fortement les gènes caractéristiques des deux autres groupes.

Lors de ce travail nous nous sommes essentiellement intéressés aux DLBCL de type ABC en raison de l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B dans ce sous-type (*cf.* Paragraphe 3.2).

La classification des DLBCL communs sur des critères morphologiques a permis d'identifier les variants centroblastiques, immunoblastiques et anaplasiques. Cependant, cette classification n'est pas fiable du fait de la difficulté de reproductibilité entre observateurs. La classification reposant sur des critères immunohistochimiques fait la distinction entre les DLBCL positifs pour le marqueur CD5, les DLBCL GCB (*Germinal Center B cell like* ; CD10<sup>+</sup>, BCL6<sup>+</sup> et IRF4<sup>-</sup>) et non-GCB (CD10<sup>-</sup>, BCL6<sup>+/-</sup>, et IRF4<sup>+</sup>).

## 2. Immunophénotype des DLBCL communs

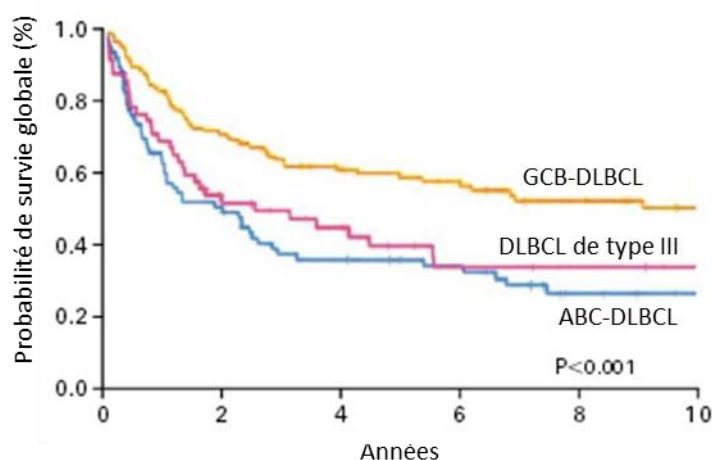
Les cellules de DLBCL communs expriment fréquemment des marqueurs B tels que CD19, CD79A, CD20, CD22, et PAX5. Dans la plupart des cas (50 à 75%), ces cellules expriment également une immunoglobuline de surface (Harris *et al.*, 1994). L'isotype de BCR exprimé par les cellules tumorales est corrélé au sous-groupe moléculaire de DLBCL : ceux de type ABC expriment un BCR de type IgM tandis que ceux de type GCB expriment un BCR de type IgG ou IgA (Ruminy *et al.*, 2011). Les gènes codant les immunoglobulines sont réarrangés et sont porteurs de mutations somatiques dans les régions variables du locus IgH (Küppers *et al.*, 1997 ; Klein *et al.*, 1998). Le processus d'hypermutation somatique des gènes *IGHV* dépendant d'AID affecte également des oncogènes dans plus de 50% des DLBCL tels que *PIM1*, *PAX5*, et *MYC* (Pasqualucci *et al.*, 2001). Dans ces tumeurs, le gène *MYC* peut aussi être transloqué dans 5 à 10% des cas, posant la question de la frontière avec les lymphomes de Burkitt (Kramer *et al.*, 1998). En effet, la classification des cancers hématologiques établie en 2008 par l'OMS (ou WHO) comporte une nouvelle catégorie de « lymphomes B inclassables ». L'aspect morphologique de ces lymphomes présente des caractéristiques intermédiaires entre celles des lymphomes de Burkitt (apparence de « ciel étoilé » souvent retrouvée) et celles des DLBCL (présence de grandes cellules). Les plus fortes surexpressions de *MYC* semblent correspondre aux cas les plus agressifs de DLBCL communs et les plus résistants aux thérapeutiques standards (Smith *et al.*, 2010).

Les DLBCL communs auraient pour origine des cellules B activées suite à la rencontre avec l'antigène et qui seraient soit à un stade centre germinatif, soit à un stade post-centre germinatif.

Les DLBCL communs peuvent exprimer le marqueur CD5 (10% des cas) ou CD10 (30 à 60% des cas). La surexpression de *BCL2* est fréquemment associée à ces lymphomes et est un facteur de mauvais pronostic (Hermine *et al.*, 1996 ; Lossos *et al.*, 2004). Le gène *BCL6* est réarrangé dans 20 à 40% des cas (Kramer *et al.*, 1998) et présentent des mutations dans la région 5' non codante dans environ 70% des cas (Migliazza *et al.*, 1995). Le marqueur post-centre germinatif IRF4/MUM1 est exprimé dans environ 40-50% des cas, parfois associé avec la dérégulation de *BCL6*. Comme évoqué ci-dessus, la classification des DLBCL au diagnostic selon l'expression des marqueurs CD10, *BCL6* et IRF4 permet de distinguer les cas GCB (*Germinal center B-cell* ; CD10<sup>+</sup>, *BCL6*<sup>+</sup>, et IRF4<sup>-</sup>) et non-GCB (CD10<sup>-</sup>, *BCL6*<sup>+/-</sup>, et IRF4<sup>-</sup>). Il est à noter que la combinaison de ces marqueurs n'a pas de valeur pronostic (Copie-Bergman *et al.*, 2009 ; Salles *et al.*, 2011).

### 3. Groupes moléculaires des DLBCL communs

Comme décrit précédemment, la distinction entre les différents groupes moléculaires de DLBCL communs est apparue importante étant donné que ces sous-types de lymphomes diffèrent dans leur réponse à la polychimiothérapie standard (Rosenwald *et al.*, 2002). Ces travaux ont montré que les DLBCL communs de type ABC sont de plus mauvais pronostic que ceux de type GCB. Les DLBCL communs de type III, comme les ABC-DLBCL, sont associés à un plus mauvais pronostic (Figure 31).



**Figure 31** : Courbes de survie en fonction du groupe moléculaire de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). Les patients atteints d'un DLBCL de type ABC (Activated B-cell like) ou d'un DLBCL de type III ont une probabilité de survie globale moins élevée que celle des patients atteints d'un DLBCL de type GCB (Germinal center B-cell like). (Rosenwald *et al.*, 2002).

#### 3.1 Le sous-groupe GCB « Germinal center B cell like »

Le groupe GCB est caractérisé par une signature transcriptomique comparable à celle des cellules B du centre germinatif avec expression de CD10, CD38 et BCL6 (Hans *et al.*, 2004). Les lésions génétiques spécifiques des DLBCL de type GCB sont la translocation t(14 ;18) impliquant le gène *BCL2*, la délétion du suppresseur de tumeur PTEN conduisant à l'activation constitutive de la voie anti-apoptotique PI3K/AKT, l'amplification d'un cluster de micro-ARN miR-17-92 impliqué dans la régulation négative de PTEN, P53, BIM et E2F1 et l'amplification du locus REL (Lenz *et al.*, 2008a). Environ 10% des cas de DLBCL de type GCB sont également caractérisés par une amplification du gène *MDM2*, régulateur négatif du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Lenz *et al.*, 2008a). Notons que les altérations touchant le gène *TP53* sont associées à un

mauvais pronostic dans ce groupe de tumeurs (Young *et al.*, 2008). Une étude a montré l'existence de mutations somatiques au niveau de l'oncogène *EZH2* codant une histone méthyltransférase dans 21,7% des cas de DLBCL de type GCB (Morin *et al.*, 2010).

### 3.2 Le sous-groupe ABC « Activated B-cell like »

Le groupe ABC présente une signature comparable à celle des lymphocytes B activés post centre germinatif avec expression du facteur de transcription XBP1, régulateur clé de la sécrétion d'immunoglobulines (Wright *et al.*, 2003 ; Shaffer *et al.*, 2004). Les DLBCL de type ABC présentent fréquemment des inactivations du gène *BLIMP1* causées par des délétions ou des mutations ayant pour effet le blocage de la différenciation en plasmocyte, suggérant que l'inhibition de la différenciation terminale pourrait être un mécanisme de la pathogenèse de ces DLBCL (Tam *et al.*, 2006 ; Pasqualucci *et al.*, 2006). Parmi les gènes surexprimés dans les ABC-DLBCL, nombre d'entre eux sont la cible du facteur de transcription NF- $\kappa$ B tels ceux codant IRF4, CFLAR/c-Flip, BCL2, Cycline D2, CCR7, et I $\kappa$ B $\alpha$  (Hans *et al.*, 2004 ; Lenz *et al.*, 2008a ; Davis *et al.*, 2001).

Parmi les altérations géniques les plus fréquemment associées aux DLBCL de type ABC (30% des cas), il y a la délétion du locus INK4-ARF codant p16 (un activateur de la sénescence) et p14 (activateur de P53). La perte de ces suppresseurs de tumeur bloque l'action des agents chimiothérapeutiques ce qui pourrait contribuer au mauvais pronostic DLBCL de type ABC (Lenz *et al.*, 2008c). D'autre part, une expression et une activation élevées de STAT3 ont été mises en évidence dans des DLBCL de type ABC et sont corrélées à un mauvais pronostic (Ding *et al.*, 2008). Des expériences d'inhibition de STAT3 par shRNA dans des lignées de DLBCL de type ABC conduit à la mort des cellules suggérant que STAT3 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans ce type de lymphomes (Scuto *et al.*, 2011).

En rapport avec leur signature transcriptomique, plus de 50% des cas d'ABC-DLBCL présentent des altérations de régulateurs positifs ou négatifs de la voie NF- $\kappa$ B (Lenz *et al.*, 2008a ; Compagno *et al.*, 2009). L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B conduit à la mort des cellules d'ABC-DLBCL sans affecter les cellules de GCB-DLBCL démontrant la dépendance du sous-type ABC à cette voie de signalisation (Lam *et al.*, 2005) (*cf.* Paragraphe 5).



#### 4. Les autres signatures de DLBCL

##### 4.1 Signature stromale

Des travaux ont porté sur le rôle de la nature du microenvironnement tumoral dans la survie des patients et ont mis en évidence deux nouvelles signatures prédictives de la survie des patients (Lenz *et al.*, 2008c). Ces deux signatures reflètent les caractéristiques des cellules non-tumorales des DLBCL.

La signature « stromal-1 » est caractérisée par l'expression de gènes des tissus mésenchymateux normaux, la plupart codant des protéines impliquées dans la constitution et le remodelage de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, laminines). Cette signature est associée à un pronostic favorable.

La signature « stromal-2 », quant à elle, est associée à une augmentation de la densité de la vascularisation tumorale et à un pronostic plus défavorable.

Cette étude a mis en évidence de nouvelles perspectives dans le développement de stratégies thérapeutiques futures avec la prise en compte du microenvironnement tumoral, celui-ci étant important dans l'évolution de la pathologie.

##### 4.2 Signature métabolique

Une étude s'intéressant à l'hétérogénéité transcriptionnelle des DLBCL a identifié trois groupes fonctionnels de DLBCL sur la base de l'analyse de profils d'expression génique (Monti *et al.*, 2005).

Le type « BCR/prolifération » qui se caractérise par une expression élevée des acteurs de la signalisation du BCR (CD19, CD79A, SYK) ainsi que des acteurs responsables de la régulation du cycle cellulaire tel que CDK2. Les tumeurs de ce groupe présentent aussi une expression importante des gènes impliqués dans la réparation à l'ADN. Enfin une expression élevée des facteurs PAX5 et BCL6 est aussi retrouvée.

Le groupe « phosphorylation oxydative » (« OxPhos-DLBCL») caractérisé par une forte expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative ou responsables des fonctions

mitochondriales. Ce groupe présente également une expression élevée de la protéine anti-apoptotique BCL2.

Enfin le troisième groupe, « réponse de l'hôte », dont la signature est déterminée par la réponse inflammatoire de l'hôte plutôt que par les cellules tumorales elles-mêmes. Les tumeurs de ce groupe présentent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'activation des cellules T et NK, des récepteurs aux cytokines et des molécules d'adhésion.

Une étude plus récente a permis de mettre en évidence une signature métabolique du sous-type « BCR/prolifération » appelée « Non-OxPhosph/BCR » et du sous-type « phosphorylation oxydative » nommée « OxPhos-DLBCL » (Caro *et al.*, 2012). Le groupe « Non-OxPhosph/BCR » est caractérisé par une glycolyse plus élevée que celle du groupe « OxPhos-DLBCL ». Ce dernier groupe, quant à lui, se caractérise par des fonctions mitochondriales plus importantes, une augmentation de l'incorporation des dérivés carbonés dans le cycle des acides tricarboxyliques et une augmentation de la lipogenèse. De plus, l'inhibition du processus d'oxydation des acides gras s'avère toxique pour les tumeurs du sous-groupe « OxPhos-DLBCL ». Ce groupe est insensible à l'inhibition de la signalisation du BCR suggérant une dépendance à d'autres mécanismes pour leur survie.

Ces travaux montrent l'hétérogénéité des profils métaboliques associés aux DLBCL et pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

## 5. DLBCL et thérapeutique

Les stratégies thérapeutiques comprennent la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement de référence des DLBCL communs repose sur une immunochemiothérapie qui associe l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) à une polychimiothérapie comprenant cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prédnisone (combinaison CHOP). Ces thérapies améliorent la survie globale des patients à 4 ans qui est de 69% (Lenz *et al.*, 2008c ; Salles *et al.*, 2011). Malgré une meilleure prise en charge thérapeutique, environ 15% des DLBCL communs sont réfractaires aux thérapeutiques actuelles.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la survie des patients atteints d'ABC-DLBCL est moins bonne que celle des patients atteints de GCB-DLBCL (Rosenwald *et al.*, 2002). Etant

donné l'importance de la voie NF- $\kappa$ B dans les ABC-DLBCL, leur sensibilité aux inhibiteurs de cette voie a été testée. L'utilisation d'un dérivé végétal de soja, la génistéine, empêche l'activation de la voie NF- $\kappa$ B *in vitro* dans des cellules de cancer de la prostate (Davis *et al.*, 1999). L'administration de génistéine à des souris SCID ayant développé des tumeurs issues de DLBCL communs par xénogreffe conduit à une augmentation de l'efficacité de l'activité antitumorale de la polychimiothérapie CHOP (Mohammad *et al.*, 2003).

Une autre étude a utilisé le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, qui empêche la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (*Inhibitor of NF- $\kappa$ B*) (Dunleavy *et al.*, 2009 ; Bu *et al.*, 2013). Les résultats ont montré que l'utilisation du bortezomib augmente l'efficacité de la chimiothérapie uniquement dans les cas d'ABC-DLBCL.

Une autre approche d'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B est de cibler les voies de signalisation qui l'activent telles que la signalisation du BCR. Par exemple l'inhibiteur de SYK, le R406, est capable d'induire l'apoptose de lignées d'ABC-DLBCL (Chen *et al.*, 2008).

Une autre molécule (PCI-32765), inhibitrice de la protéine BTK impliquée dans la signalisation du BCR est capable d'induire l'apoptose de lignées d'ABC-DLBCL. La molécule PCI-32765 a révélé un effet anti-tumoral dans les premières étapes d'un essai clinique (Honigberg *et al.*, 2010).

D'autres travaux ont identifié des dérivés de phénothiazines comme étant des inhibiteurs de l'activité protéolytique de la paracaspase MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein-1*) et donc de l'activité NF- $\kappa$ B. Ces molécules présentent un effet toxique uniquement sur les lignées d'ABC-DLBCL (Nagel *et al.*, 2012).

## VI. Le facteur de transcription NF-κB

La voie de signalisation NF-κB, dont l'activation est constitutive dans les DLBCL de type ABC, est présentée dans ce chapitre. Nous décrivons les différentes sous-unités NF-κB, les inhibiteurs de la famille IκB, les voies de signalisation classique et alternative, les fonctions biologiques de NF-κB ainsi que les différentes altérations des régulateurs de la voie NF-κB retrouvées dans les DLBCL de type ABC.

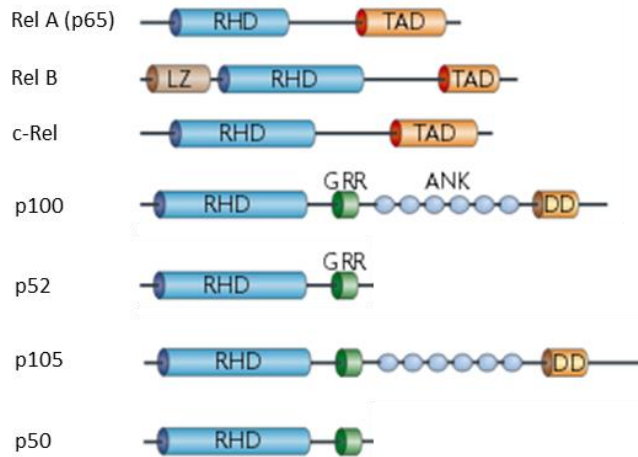
En 1986, le groupe de Baltimore caractérise, pour la première fois, le facteur de transcription NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) grâce aux régions régulatrices de la chaîne légère kappa des immunoglobulines. Les différents membres de la famille NF-κB se fixent à l'ADN grâce à une séquence κB de dix paires de bases : 5'-GGGACTTCC-3' (Sen and Baltimore, 1986). Le facteur NF-κB est exprimé de façon ubiquitaire. Il est impliqué, *via* sa fixation au niveau de sites κB des régions régulatrices des gènes, dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'immunité, la réponse inflammatoire, la réponse au stress cellulaire, la prolifération et la survie cellulaires, l'angiogenèse et l'apoptose. Une dérégulation du facteur NF-κB est retrouvée dans plusieurs pathologies dont le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme et des maladies neuro-dégénératives (Courtois and Gilmore, 2006).

L'activité NF-κB est régulée par la nature des complexes formés par les différentes sous-unités NF-κB, les inhibiteurs impliqués, les voies de signalisation mises en jeu et les sites κB retrouvés au niveau des séquences promotrices des gènes cibles.

### 1. Les sous-unités NF-κB

La famille NF-κB comprend cinq membres structurellement proches et agissant sous forme homo ou hétérodimérique (Figure 32) : p50 et son précurseur p105 (NF-κB1), p52 et son précurseur p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB et c-Rel. Chacune de ces sous-unités est caractérisée par la présence d'un domaine RHD (*Rel Homology Domain*) amino-terminal, hautement conservé et responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Verma *et al.*, 1995). RelA, c-Rel et RelB contiennent également un domaine TAD carboxy-terminal. Les membres p50 et p52 étant dépourvus du domaine TAD, ils activent la transcription grâce à leur interaction avec les autres sous-unités. Ils peuvent également réprimer la transcription en se fixant au niveau des sites κB sous forme d'homodimères (Hayden and Ghosh, 2008). Les précurseurs p100 et p105

contiennent, dans leur partie carboxy-terminale, plusieurs répétitions ankyrines impliquées dans leur localisation cytoplasmique ce qui leur confèrent des propriétés inhibitrices.



**Figure 32 : Représentation schématique des membres de la famille NF- $\kappa$ B.**

Les membres de la famille NF- $\kappa$ B sont caractérisés par la présence d'un domaine RHD (Rel Homology Domain). RelA, c-Rel et RelB contiennent un domaine de transactivation (TAD). RelB possède un domaine amino-terminal de type glissière à leucines (LZ). Les protéines précurseurs p100 et p105 possèdent des répétitions ankyrines (ANK) ainsi qu'une région riche en glycines (GRR). (Ghosh and Hayden, 2008).

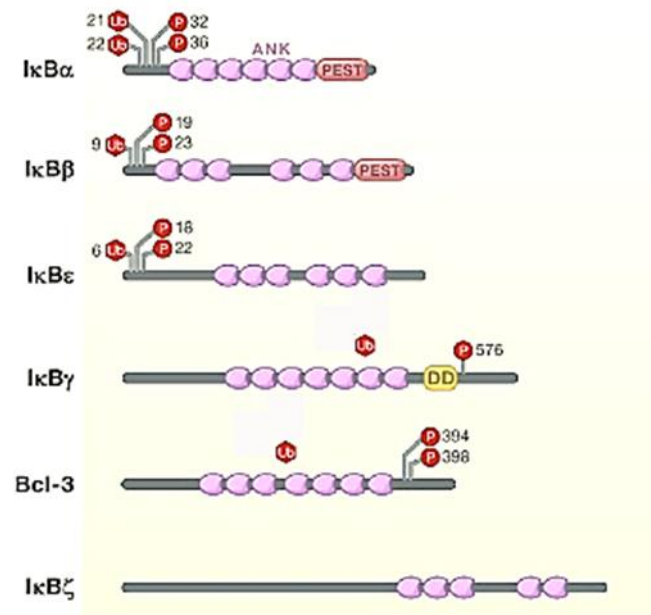
Les sous-unités NF- $\kappa$ B forment des homodimères ou des hétérodimères, à l'exception de RelB qui n'est retrouvé que sous forme hétérodimérique. Elles sont transloquées dans le noyau grâce à leur séquence NLS.

*In vivo*, la stabilité des dimères varie et ils présentent des affinités de liaison à l'ADN différentes. Les homodimères c-Rel/c-Rel sont plus stables que les homodimères RelA/RelA. Les sous-unités p50 et p52 se lient préférentiellement au niveau de la partie 5' des sites  $\kappa$ B alors que RelA, c-Rel et RelB se lient sur la partie 3' (Chen and Ghosh, 1999).

## 2. Les inhibiteurs I $\kappa$ B

Des protéines particulièrement importantes dans la régulation de l'activité NF- $\kappa$ B interagissent avec les sous-unités NF- $\kappa$ B : il s'agit des protéines inhibitrices de la famille I $\kappa$ B, dont la plus connue est I $\kappa$ B $\alpha$  (Figure 33). Ces inhibiteurs séquestrent les complexes NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme des cellules au repos. Ils peuvent aussi entrer dans le noyau, détacher les complexes NF- $\kappa$ B de l'ADN et provoquer leur export dans le cytoplasme (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997).

La famille des protéines IκB inclue IκBα, IκBβ, IκBε, les précurseurs p100 (IκBδ) et p105 (IκBγ), ainsi que des inhibiteurs atypiques tels qu'IκBζ (codée par *NFKBIZ*), Bcl-3 (*B Cell Lymphoma 3*) et IκBNS (codée par *NFKBID*). Les molécules IκB atypiques (IκBζ, Bcl-3 et IκBNS) sont présentes à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Bcl-3 est impliqué à la fois dans la transactivation et la répression des gènes cibles de NF-κB et interagit avec les complexes contenant p50 et p52 (Wulczyn *et al.*, 1992 ; Bours *et al.*, 1993 ; Nolan *et al.*, 1993). IκBζ agit à la fois comme un régulateur positif et négatif des gènes cibles de NF-κB et se lie préférentiellement à la sous-unité p50 (Motoyama *et al.*, 2005). Enfin, IκBNS se fixe aussi à la sous-unité p50 et semble réguler positivement ou négativement les gènes cibles de NF-κB en fonction du type cellulaire (pour revue : Yamamoto and Takeda, 2008).



**Figure 33 : Représentation schématique des inhibiteurs de la famille IκB (Inhibitor of NF-κB).**

Les inhibiteurs de la famille IκB présentent des répétitions ankyrines (ANK) ainsi que des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation. IκBα et IκBβ possèdent un domaine PEST (riche en Proline, Acide Glutamique, Serine et Thréonine) en carboxy-terminal. (Hayden and Ghosh, 2008)

DD : Death Domain.

Les protéines IκB sont caractérisées par la présence de répétitions ankyrines permettant l'interaction avec les dimères NF-κB. L'interaction des protéines IκB classiques (IκBα, IκBβ, IκBε) et des précurseurs p100 et p105 avec les dimères NF-κB masque leur séquence de localisation nucléaire, empêchant alors leur transport dans le noyau.

L'activité des protéines IκB est régulée par phosphorylation en sérine, puis protéolyse. Elles possèdent des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation permettant leur dégradation par le protéasome (pour revue : Karin and Ben-Neriah, 2000). Par exemple, IκBα est phosphorylé au niveau des sérines S32 et S36, puis ubiquitinylé sur les lysines K21 et K22 permettant leur prise en charge par le protéasome. Malgré des structures similaires, les inhibiteurs de la famille IκB présentent des affinités différentes vis-à-vis des sous-unités NF-κB. En effet, IκBα et IκBβ se lient préférentiellement aux hétérodimères RelA/p50, tandis qu'IκBε lie les complexes RelA/RelA et c-Rel/RelA (Weil *et al.*, 1997 ; Whiteside *et al.*, 1997 ; pour revue : Karin and Ben-Neriah, 2000). Les précurseurs p100 et p105 se comportent aussi comme des inhibiteurs de la famille IκB. Les répétitions ankyrines de p105 permettent sa fixation aux sous-unités p50, RelA et c-Rel conduisant à leur séquestration dans le cytoplasme (Liou *et al.*, 1992 ; Mercurio *et al.*, 1993). Au contraire p100 se lie à RelB sans avoir d'effet sur les autres sous-unités NF-κB (Solan *et al.*, 2002). Cependant des études plus récentes suggèrent que p100 pourrait également jouer un rôle dans la régulation des dimères RelA (Basak *et al.*, 2007).

### 3. Les voies de signalisation NF-κB

De nombreux stimuli parmi lesquels des cytokines pro-inflammatoires, des mitogènes, des produits viraux ou bactériens et diverses formes de stress cellulaires (radicaux libres et UV) sont à l'origine de l'activation de la signalisation NF-κB.

Deux voies principales d'activation de NF-κB conduisent à la translocation des complexes NF-κB dans le noyau : la voie d'activation classique (canonique) et la voie alternative (non canonique).

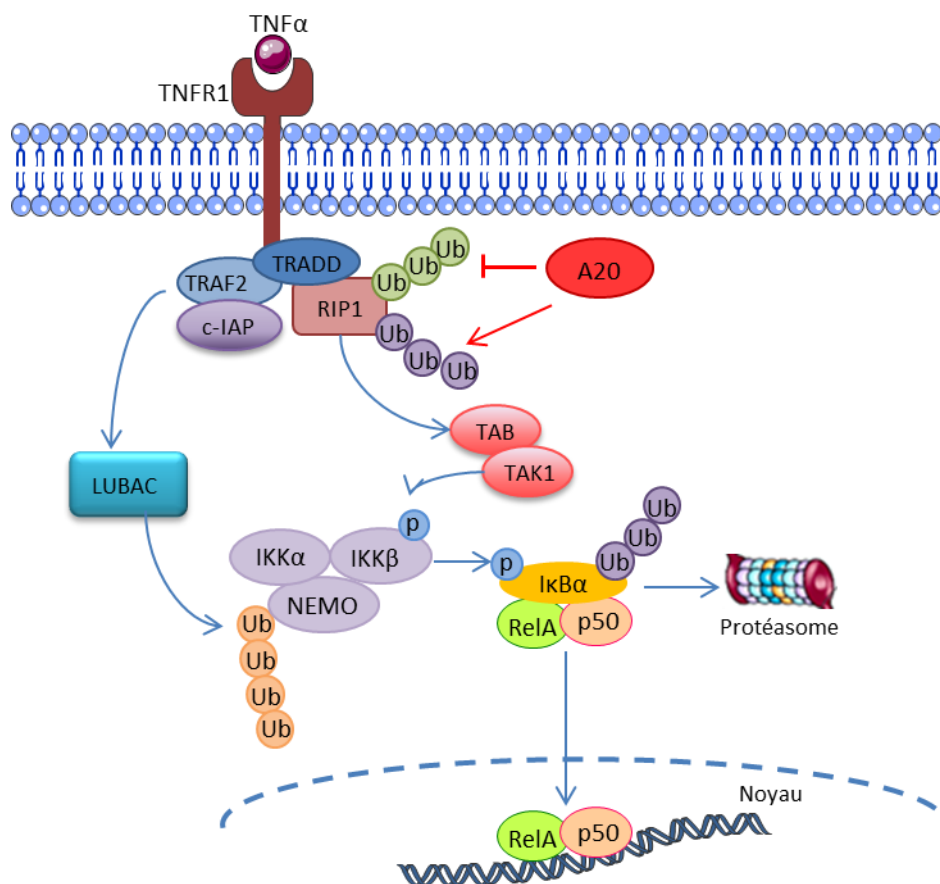
#### 3.1 La voie d'activation classique (canonique)

La voie NF-κB classique est activée suite à l'engagement de certains récepteurs comme celui du TNFα, de l'IL-1 (Israël *et al.*, 1989), le BCR suite à la stimulation antigénique, ou les TLR en réponse à des stimuli bactériens et viraux (Cahir McFarland *et al.*, 1999 ; Sun and Ballard, 1999). Différentes protéines sont impliquées dans l'activation de la voie NF-κB en fonction du récepteur impliqué. La stimulation des TLR conduit au recrutement des protéines MYD88, IRAK1 et IRAK4 (*Interleukin-1 Receptor Associated Kinase*). Celle du BCR implique les protéines CARD11,

BCL10 et MALT1 qui forment le complexe CBM (CARMA1-BCL10-MALT1). La stimulation du TNFR1, quant à elle, conduit au recrutement de la protéine adaptatrice TRADD, de TRAF2 (ou TRAF5), des protéines c-IAP1/2 (*c-Inhibitors of Apoptosis Protein*) et de la kinase RIP1.

Cette voie canonique NF-κB est classiquement impliquée dans les réponses rapides et réversibles telles que l'inflammation.

L'activation des dimères NF-κB implique l'activation/inhibition de plusieurs protéines de la signalisation. Ces régulations font intervenir des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations et des ubiquitinations (Figure 34).



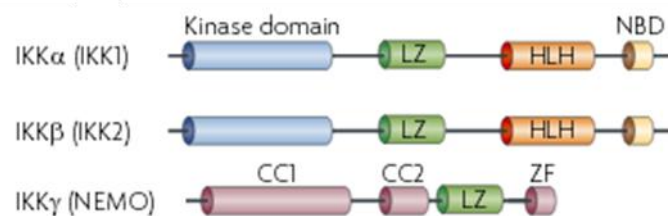
**Figure 34 : Voie d'activation classique NF-κB.**

La stimulation des récepteurs par leurs ligands favorise l'activation des voies de signalisation, et est coordonnée par la polyubiquitination. Ces chaînes de polyubiquitine sont essentielles pour le déclenchement de l'activation de NF-κB. Par exemple, l'activation de la protéine RIP1 dépend de sa polyubiquitination Lys 63 (cercles verts). Dans la voie classique NF-κB, le complexe LUBAC permet l'activation du complexe IKK grâce à la polyubiquitination linéaire (cercles oranges) de la sous-unité NEMO. L'ubiquitination Lys 63 de RIP1 provoque le recrutement du complexe TAB/TAK1 capable de phosphoryler IKKβ. IKKβ phosphoryle à son tour IκBα, conduisant à son ubiquitination Lys 48 (cercles violets) et à sa dégradation par le protéasome conduisant la translocation des dimères NF-κB dans le noyau. A20 inhibe ces différentes voies de signalisation NF-κB en modifiant le statut des protéines de signalisation, telles que RIP. (inspiré d'après Hymowitz & Wertz, 2010).

TNF : Tumeur necrosis factor ; TNFR : TNF receptor ; TRAF : Tumeur necrosis factor receptor-associated factor ; IAP : associated inhibitor of apoptosis ; IKK : IκB kinase ; RIP ou RIPK : receptor-interacting protein serine/threonine kinase ; TRADD : TNF-α receptor associated death domain ; TAB : TAK1-binding protein ; TAK : TGF-activated kinase ; NEMO : NF-κB essential modulator ; Ub : Ubiquitine ; P : groupement phosphate.



L'ubiquitination de nombreuses protéines ainsi que l'utilisation de différents types de chaînes d'ubiquitine jouent un rôle majeur dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (pour revues : Iwai, 2012 ; Schmukle and Walczak, 2012). Trois classes d'enzymes interviennent dans ce processus : une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et une ubiquitine-ligase (E3). L'ajout d'une chaîne d'ubiquitines K48 sur un substrat déclenche sa dégradation par le protéasome. Au contraire, la fixation d'une chaîne d'ubiquitines K63 conduit à l'activation du substrat. Enfin, la polyubiquitination linéaire provoque une modification de fonction du substrat et a donc différents effets cellulaires. Cette dernière fait intervenir le complexe LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) qui intervient dans la signalisation NF- $\kappa$ B grâce à l'activation du complexe IKK. Ce complexe multi-protéique est composé de deux sous-unités catalytiques (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) et d'une sous-unité régulatrice (IKK $\gamma$  aussi appelée NEMO pour *NF- $\kappa$ B Essential Modulator*) (pour revue : Israël, 2000) (Figure 35). Des deux sous-unités catalytiques, IKK $\beta$  est responsable de l'essentiel de l'activité kinase du complexe IKK dans la plupart des types cellulaires (Li *et al.*, 1999). Notons l'exception des cellules épithéliales mammaires stimulées par RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand*) dans lesquelles IKK $\alpha$  est à l'origine de l'activité kinase (Cao *et al.*, 2001).



**Figure 35 : Représentation schématique des sous-unités du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase).**

Les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  interagissent avec le premier domaine coiled-coil (CC1) de NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator) grâce à leur domaine NBD (Nemo Binding Domain). NEMO contient également un deuxième domaine coiled-coil (CC2), un domaine LZ (Leucine Zipper) et un domaine ZF (Zinc Finger). (Ghosh and Hayden, 2008).

HLH : Helix-Loop-Helix

La polyubiquitination linéaire de la sous-unité régulatrice IKK $\gamma$  (NEMO) par le complexe LUBAC lui permet de recruter les sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  qui sont alors activées par phosphorylation grâce à la kinase TAK1. C'est l'ubiquitination K63 de RIP1, probablement par TRAF2/5, qui provoque le recrutement du complexe TAK1/TAB1/TAB2 (*TAK1 Binding Protein*) responsable de l'activation de TAK1.

L'activation du complexe IKK conduit à la phosphorylation de la protéine inhibitrice IκBα au niveau de résidus sérines spécifiques (S32 et S36) (pour revue : Karin and Ben-Neriah, 2000). Puis l'ubiquitination K48 sur IκBα provoque sa dégradation par le protéasome et la translocation des complexes NF-κB.

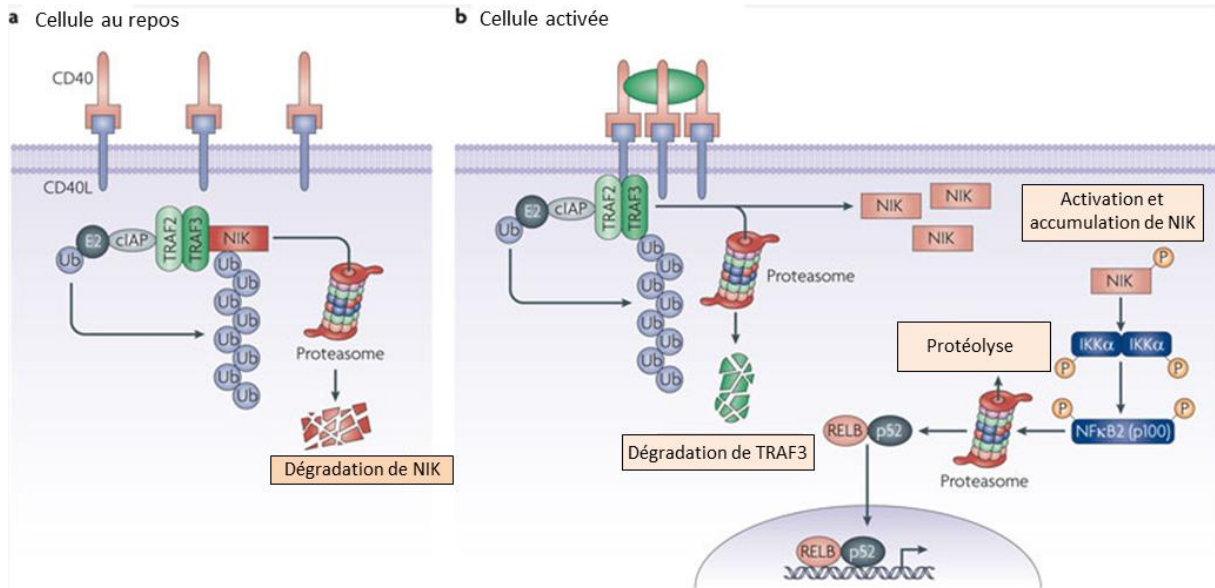
Les complexes essentiellement mis en jeu lors de l'activation de la voie classique NF-κB sont les homodimères RelA, les complexes RelA/p50 et c-Rel/p50. Une fois dans le noyau, les complexes NF-κB se fixent sur les séquences consensus afin d'activer ou de réprimer la transcription des gènes cibles.

### 3.2 La voie d'activation alternative (non canonique)

Une seconde voie d'activation de NF-κB, qui s'applique principalement aux complexes contenant RelB, a été caractérisée. Cette voie, appelée voie alternative, est initiée par différents membres de la superfamille du TNF comme le CD40 ligand, la lymphotoxine Béta (LTβ) et le facteur BAFF (*B cell Activating Factor*) (Senftleben *et al.*, 2001 ; Claudio *et al.*, 2002). La protéine virale LMP1 de l'EBV active également la voie alternative NF-κB (*cf.* Chapitre II) (Luftig *et al.*, 2004). Cette voie alternative NF-κB est impliquée dans des réponses lentes et irréversibles telles que l'organogenèse ou la maturation des cellules B.

La plupart des récepteurs activateurs de la voie alternative sont également des inducteurs de la voie classique.

La voie alternative d'activation de NF-κB repose sur la protéolyse de p100, inhibiteur de RelB (pour revue : Dejardin, 2006). Cette voie est dépendante de l'activation de la kinase NIK (*NF-κB Inducing Kinase*) (Figure 36).



**Figure 36 :** Voie d'activation alternative (non canonique) de NF- $\kappa$ B.

a. Dans une cellule au repos, la protéine NIK (NF- $\kappa$ B Inducing Kinase) est associée dans le cytoplasme à la protéine TRAF3 (TNFR-Associated Factors), elle-même associée aux protéines TRAF2 et c-IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) conduisant à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome.

b. Lors d'une stimulation par le CD40 ligand, la protéine NIK est dirigée vers la membrane plasmique où TRAF3 est dégradée. Cette dégradation permet la stabilisation de NIK, puis son activation par autophosphorylation. NIK phosphoryle alors IKK $\alpha$  qui va à son tour phosphoryler p100. Cette phosphorylation conduit à la dégradation de p100, libérant ainsi les complexes contenant RelB qui sont alors transloqués dans le noyau. (modifié d'après Gyrd-Hansen and Meier, 2010).

Dans les cellules non-stimulées, NIK est associée dans le cytoplasme à la protéine TRAF3 qui est elle-même associée avec TRAF2 et aux protéines c-IAP1/2 (*Inhibitors of Apoptosis*). Dans ces conditions, l'activité ubiquitine-ligase des c-IAP1/2 greffe des chaînes d'ubiquitine sur NIK induisant sa dégradation. Par exemple, lors d'une stimulation par le CD40 ligand, le complexe c-IAPs/TRAF2/TRAF3 est recruté par le récepteur CD40 ce qui conduit à l'ubiquitination de TRAF3 par les c-IAPs puis à sa dégradation (Vallabhapurapu *et al.*, 2008). En l'absence de TRAF3, la protéine NIK s'accumule et ne peut plus être recrutée par le complexe c-IAPs/TRAF2. La stabilisation de NIK s'accompagne de son activation par autophosphorylation. NIK phosphoryle alors IKK $\alpha$  qui va à son tour phosphoryler p100 alors associée à RelB. Cette phosphorylation conduit à l'ubiquitination de p100 aboutissant soit à la dégradation totale de p100 et à la libération des dimères RelB/p50 (Derudder *et al.*, 2003), soit à la protéolyse partielle de p100, libérant alors des dimères RelB/p52 (Dejardin *et al.*, 2002).

Ces dernières années de nombreux mécanismes de régulation réciproque de ces deux voies ont été décrits (Shih *et al.*, 2011). Plusieurs données indiquent des interconnexions entre la voie classique et la voie alternative via le contrôle de l'expression des sous-unités NF- $\kappa$ B. L'interdépendance entre les deux voies peut se jouer au niveau transcriptionnel. En effet, des

travaux ont montré que les régions régulatrices des gènes codant RelB et p100 contiennent des sites κB et que l'expression de ces gènes est dépendante de RelA (Liptay et al., 1994 ; Bren et al., 2001). L'activation des dimères contenant RelB, suite à une stimulation par la lymphotoxine β, est défectueuse dans les MEF déficients pour RelA, suggérant que l'expression de RelB sous la dépendance de RelA est le principal déterminant de la réponse de la voie alternative en réponse à la stimulation du récepteur à la lymphotoxine β (Basak et al., 2008).

Parmi les premières études de surexpression, des travaux ont montré que RelA pouvait être associé à la partie carboxy-terminale de p100, suggérant un effet inhibiteur de ce précurseur sur RelA (Mercurio et al., 1993). En effet des souris exprimant une forme de p100 ne subissant pas de dégradation présentent un défaut d'activation des complexes contenant RelA et un défaut dans le développement des organes lymphoïdes secondaires (Tucker et al., 2007).

De manière intéressante, des souris déficientes pour RelA dans un contexte TNFR1<sup>-/-</sup> présentent un phénotype identique à celui observé chez des souris déficientes pour des acteurs de la voie alternative, à savoir une absence de ganglions lymphatiques, de plaques de Peyer et une désorganisation de l'architecture splénique (Alcamo et al., 2002).

D'autres travaux ont mis en évidence une association entre RelA et Rel B dans le noyau de MEF stimulés par le TNFα. La séquestration de RelB dans les hétérodimères RelA/RelB empêche sa liaison à l'ADN. La phosphorylation de RelA sur la sérine 276, induite par le TNFα, est cruciale pour la formation des complexes RelA/RelB (Jacque et al., 2005).

Plus récemment, des données ont montré que RelB peut empêcher la liaison à l'ADN de RelA en séquestrant son partenaire p50, démontrant un effet inhibiteur de RelB sur RelA. De plus, RelA augmente l'expression de p100 conduisant à une inhibition de RelB (Chanut et al., 2013).

#### 4. A20, régulateur de la voie NF-κB

La protéine A20, codée par le gène *TNFAIP3*, se compose de 790 acides aminés. Elle comprend un domaine OTU (*Ovarian Tumor*) dans la région amino-terminale et sept répétitions en doigts de zinc (ZnF) dans la partie carboxy-terminale (Opipari et al., 1990).

La transfection d'A20 conduit à une protection des cellules vis à vis de l'apoptose induite par le TNF (Opipari *et al.*, 1992). Ainsi, la première fonction décrite de la protéine A20 est un rôle inhibiteur de l'apoptose.

Plusieurs groupes ont ensuite montré que la surexpression d'A20 entraînait une inhibition de l'activation NF-κB en réponse au TNF ou à l'IL-1 (Jäättelä *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1996). Les souris A20 déficientes, hypersensibles au TNF et au LPS (LipoPolySaccharide), présentent une activation constitutive de la voie NF-κB (Lee *et al.*, 2000). Ces animaux meurent peu après leur naissance d'une inflammation multi-organes sévère et d'une cachexie, démontrant le rôle clé d'A20 dans la régulation de l'inflammation NF-κB-dépendante. En 2004, deux études ont révélé l'existence d'un domaine porteur d'une activité désubiquitinase au niveau de la région amino-terminale d'A20 (Wertz *et al.*, 2004 ; Evans *et al.*, 2004). L'activité désubiquitinase d'A20 est impliquée dans le retrait des chaînes de polyubiquitine K63 d'acteurs de la signalisation NF-κB tels que des molécules de la famille TRAF, de la famille RIP ou encore NEMO. La désubiquitination K63 de RIP1 et TRAF6 par A20 conduit finalement à l'inhibition de la voie NF-κB. De plus, le domaine en doigt de zinc ZnF4 situé dans la partie carboxy-terminale d'A20 présente une activité E3 ubiquitine-ligase (Wertz *et al.*, 2004). Cette dernière est responsable de la polyubiquitination K48 de la protéine adaptatrice RIP1 conduisant à sa dégradation par le protéasome (Wertz *et al.*, 2004) (Figure 34).

A20 est aussi capable d'induire la dégradation par le protéasome d'enzymes de conjugaison de l'ubiquitine telles que Ubc13 et UbcH5c empêchant ainsi leur interaction avec TRAF2 et TRAF6 respectivement et conduisant donc à une inhibition de l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF2 et 6 (Shembade *et al.*, 2010 ; pour revue : Shembade and Harhaj, 2010).

La protéine A20 peut également induire la dégradation lysosomiale de ses substrats. En effet A20 conduit à une dégradation de TRAF2 dans les lysosomes (Li *et al.*, 2009).

A20 est aussi impliquée dans l'altération de l'activation du complexe IKK *via* un processus non catalytique : son rapprochement de NEMO grâce aux chaînes de polyubiquitine libres empêche la phosphorylation d'IKKβ par la kinase TAK1 (Skaug *et al.*, 2011).

Des travaux plus récents ont montré un nouveau rôle d'A20 dans la régulation négative de la voie NF-κB : A20 interagit avec NEMO par l'intermédiaire de son domaine en doigt de zinc

ZnF7 capable de lier des chaînes de polyubiquitine linéaire, empêchant ainsi l'interaction entre LUBAC et NEMO (Verhelst et al., 2012).

### 5. Les fonctions biologiques de NF-κB et cancers

De nombreux gènes cibles de la voie de signalisation NF-κB ont été mis en évidence. Dans ce paragraphe, seule une partie des gènes régulés par NF-κB sera présentée (Tableau 4). Le site <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html> recense les différents gènes cibles du facteur de transcription NF-κB.

Fonction	Gènes	Références
Facteurs impliqués dans le développement B	<i>BLIMP1, PU1</i>	Calame, 2008 Bonadies et al., 2009
Immunorécepteurs	<i>TLR9, TLR2 CD80 CCR5, CCR7 CXCR CD21 MCH class I</i>	Takeshita et al., 2004 Wang et al., 2001 Fong et al., 1996 Liu et al., 1998 ; Hopken et al., 2002 Maxwell et al., 2002 Debnath et al., 2007 Israël et al., 1989
Apoptose	<i>XIAP, IAP BCL2 CFLIP BCL-XL, BAX, BIM CD95, FAS LIGAND</i>	Turner et al., 2007 Catz and Johnson, 2001 Kreuz et al., 2001 Krikos et al., 1992 Gupta et al., 2010
Prolifération	<i>CCND1, CCND2, CCND3 MYC GADD45</i>	Guttridge et al., 1999 Iwanaga et al., 2008 Duyao et al., 1992 Gupta et al., 2010
Cytokines	<i>TNF α IL1, IL8, IL6, IL10, IL-15, IL-17 BAFF LTA, LTB</i>	Collart et al., 1990 Mori and Prager, 1996 ; Kunsch and Rosen, 1993 Gupta et al., 2010
Angiogenèse	<i>VEGF MCP1, CD34</i>	Chilov et al., 1997 Prasad et al., 2010
Invasion et formation de métastases	<i>VCAM1, CD54</i>	Iadernarco et al., 1992 van de Stolpe and van der Saag, 1996
Adhésion cellulaire	<i>CD44 ENG FN1 TNC</i>	Hinz et al., 2002 Gupta et al., 2010

**Tableau 4 :** Exemple de gènes cibles du facteur de transcription NF-κB et les fonctions cellulaires qu'ils modulent.

Inflammation : NF-κB participe à la réponse inflammatoire en modulant l'expression de gènes majeurs de l'inflammation tels que le TNFα, les interleukines IL-1, IL-6 ainsi que l'IL-8 (Mori and Prager, 1996 ; Libermann and Baltimore, 1990 ; Kunsch and Rosen, 1993). NF-κB régule aussi l'enzyme pro-inflammatoire COX2 (*Cyclo-Oxygénase 2*) dont la surexpression a été mise en évidence dans plusieurs cancers (Yamamoto *et al.*, 1998 ; Marrogi *et al.*, 2000). La dérégulation du processus inflammatoire par NF-κB influence le microenvironnement tumoral et peut ainsi promouvoir le développement de la tumeur (Karin and Greten, 2005).

Apoptose : NF-κB est également impliqué dans la régulation du processus d'apoptose. Il apparaît souvent comme un facteur de survie cellulaire de par sa capacité à induire l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que BCL2, A20, BCL-XL, les protéines c-IAPs (Catz and Johnson, 2001 ; Krikos *et al.*, 1992 ; Stehlik *et al.*, 1998). Ces facteurs anti-apoptotiques sont responsables des résistances aux chimiothérapies observées dans les cancers (Dai *et al.*, 2009 ; Hernandez-Luna *et al.*, 2013). Notons que selon le type cellulaire et/ou le stimulus reçu, le facteur NF-κB peut aussi initier l'expression de molécules pro-apoptotiques comme le récepteur de mort FAS, PUMA ou encore BAX (Shou *et al.*, 2002 ; Le Clorennec *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009).

Prolifération : NF-κB contrôle aussi l'expression de régulateurs du cycle cellulaire tels que les cyclines D1 et D2 et CDK6 (Guttridge *et al.*, 1999 ; Iwanaga *et al.*, 2008). NF-κB est également capable d'induire l'expression du proto-oncogène *MYC*, facteur maître de la prolifération (Duyao *et al.*, 1992).

Métabolisme : NF-κB peut aussi induire une conversion métabolique dans les cellules cancéreuses, de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse (effet Warburg) en induisant l'expression d'enzymes de la glycolyse (Kawauchi *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 2011).

Angiogenèse et formation de métastases : des facteurs impliqués dans l'angiogenèse ont également été décrits comme cibles de NF-κB comme par exemple le VEGF (Chilov *et al.*, 1997). NF-κB joue un rôle dans les processus d'invasion et de formation de métastases *via* l'induction de l'expression des protéines d'adhésion VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) et ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule 1*) ou encore des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Iademarco *et al.*, 1992 ; van de Stolpe and van der Saag, 1996).

## 6. Modèles murins d'activation NF-κB

L'utilisation des modèles murins d'activation ou d'inactivation de la signalisation NF-κB a apporté une contribution majeure à la compréhension des fonctions de cette cascade de signalisation et a permis de fournir des indications quant au rôle de cette voie dans la lymphomagenèse.

Les souris transgéniques pour v-rel, le variant oncogénique de c-Rel responsable de leucémies aviaires, sous le contrôle d'un promoteur spécifique des lymphocytes T développent des lymphomes et leucémies T (Carrasco *et al.*, 1996). La survenue de ces lymphomes est retardée si ces souris sont croisées avec des souris transgéniques sur-exprimant IκBα (Carrasco *et al.*, 1997). Le groupe de S. Géronidakis rapporte que des souris c-Rel B-spécifique meurent, suggérant que c-Rel pourrait être toxique à un stade donné de maturation du lymphocyte B (Gerondakis *et al.*, 2006).

Parmi les modèles murins d'activation continue de NF-κB, on distingue ceux avec invalidation des gènes codant les inhibiteurs NF-κB, notamment IκBα et A20. Les souris avec invalidation du gène codant IκBα présentent à la naissance une dermatite inflammatoire généralisée et une expansion majeure du compartiment granuleux, et les souris meurent après sept jours de vie (Beg *et al.*, 1995).

Les souris avec invalidation conditionnelle du gène codant A20 dans les cellules B présentent une hyperactivabilité NF-κB avec une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire (Chu *et al.*, 2011). Cependant, ces souris ne développent pas de lymphomes B mais présentent des pathologies autoimmunes avec splénomégalie et hyperplasie plasmocytaire ainsi qu'une augmentation du compartiment myéloïde. Par contre, une autre étude a montré que l'injection de cellules dont l'expression d'A20, inhibiteur de la voie NF-κB, est inductible par la tétracycline chez des souris immunodéprimées conduit au développement de tumeurs uniquement en absence d'A20 (Kato *et al.*, 2009).

La délétion de la moitié carboxyterminale de p100 conduit à la production d'une protéine p52 en l'absence du domaine inhibiteur de p100, mimant ainsi une activation continue de la voie non canonique. Les souris p100<sup>-/-</sup> présentent une hyperplasie gastrique et meurent après quelques mois sans développer de lymphome (Ishikawa *et al.*, 1997).



Les autres modèles d'activation NF-κB reposent sur l'activation en amont de cette voie. Ainsi, les souris transgéniques pour la protéine Tax de HTLV1, protéine activant NF-κB en se fixant sur NEMO, présentent une lymphadénopathie généralisée avec une splénomégalie en rapport avec augmentation du compartiment lymphocytaire B (Peebles et al., 1995). Ces lymphocytes B ont une réponse proliférative augmentée en réponse aux stimulations cytokiniques ou au BCR. Une activation continue de la voie non-canonique par invalidation conditionnelle de TRAF2 procure un avantage sélectif aux cellules B de la rate en les rendant indépendantes d'une stimulation par BAFF (Grech et al., 2004).

Des souris transgéniques pour des récepteurs membranaires constitutivement activés tels que LMP1 présentent une forte activité NF-κB constitutive. L'expression de LMP1 conduit au développement de lymphomes B chez des souris transgéniques après un an (Kulwichit et al., 1998). Dans un autre modèle évoqué dans la paragraphe 4.1 du chapitre II, l'établissement d'un signal CD40 constitutivement actif conduit également à l'émergence de lymphomes B à évolution lente (Hömig-Hölzel et al., 2008). Ces modèles sont certes associés à une activation continue NF-κB, mais aussi à l'activation d'autres voies telles que celles des MAP kinases dont on ne peut pas exclure le rôle dans le processus transformant.

Ces données suggèrent qu'une activation NF-κB continue, soit par la voie canonique, soit par la voie alternative, tend indubitablement à augmenter la prolifération et la survie des lymphocytes B. Mais les données de la littérature indiquent que cela n'est probablement pas suffisant pour conduire à la transformation des lymphocytes B.

## 7. Altérations affectant les régulateurs de la voie NF-κB dans les ABC-DLBCL

De nombreux gènes de la voie NF-κB sont altérés dans les ABC-DLBCL tels que *RANK*, *TRAF5*, *TRAF2*, et *TAK2* (Compagno et al., 2009). Des mutations inactivatrices du gène *TNFAIP3/A20* sont parmi les plus fréquemment retrouvées (24.3% des cas d'ABC-DLBCL) (Compagno et al., 2009 ; Honma et al., 2009). A20 est un régulateur négatif majeur de la voie NF-κB, et son invalidation (par mutations ponctuelles ou délétion) participe à la suractivation de la voie NF-κB puisque sa ré-introduction dans des lignées d'ABC-DLBCL conduit à l'apoptose (Honma et al., 2009).

En 2006, une étude a été menée pour identifier les gènes requis pour la survie et la prolifération des cellules tumorales d'ABC-DLBCL dans le but de développer de nouvelles thérapeutiques (Ngo *et al.*, 2006). Il a été montré que l'activation constitutive de NF-κB dans ces lymphomes repose sur trois molécules : CARD11 (également connue sous le nom de CARMA1), BCL10 et MALT1 qui forment le complexe CBM à l'origine de l'activation du complexe IKK lors de la stimulation du BCR. Alors que ce complexe CBM est formé transitoirement dans les cellules B normales, sa formation est constitutive dans les ABC-DLBCL. A l'origine de cette activation chronique du BCR, environ 10% des cas de DLBCL de type ABC présentent des mutations activatrices sur le gène CARD11 (Lenz *et al.*, 2008b ; Compagno *et al.*, 2009). Ces lymphomes sont également fréquemment associés, dans 20% des cas, à des mutations des molécules CD79A et CD79B qui conduisent à une augmentation de l'expression du BCR à la surface cellulaire et à une diminution de l'activité de LYN, régulateur négatif de la signalisation du BCR (Davis *et al.*, 2010).

Un travail plus récent a identifié des mutations oncogéniques récurrentes affectant la protéine MYD88 dans 39% des cas de DLBCL de type ABC (Ngo *et al.*, 2011). MYD88 est un adaptateur protéique impliqué dans la signalisation induite par les TLR. Des expériences d'ARN interférence ont révélé que MYD88 et ses kinases d'aval (IRAK1 et IRAK4) sont nécessaires à la survie des DLBCL de type ABC.

Dans les ABC-DLBCL, l'activation constitutive de la voie NF-κB peut également être mise en relation avec une activation permanente du récepteur CD40 du fait d'une production de CD40 ligand par les cellules tumorales (Pham *et al.*, 2002 ; Pham *et al.*, 2005).

Dans les cas de DLBCL associés à l'EBV, la protéine virale LMP1 conduit à l'activation constitutive de la voie NF-κB.

# **Chapitre II**

## **Objectifs**



Des travaux réalisés au laboratoire sur des modèles de lymphomes post-transplantation associés à l'EBV ont identifié MYC et NF- $\kappa$ B comme les deux systèmes transcriptionnels de la latence III, suggérant que ces deux systèmes peuvent co-exister en fonction du contexte tumoral (Faumont *et al.*, 2009). Sur la base de la physiologie de l'infection par l'EBV, son rôle dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt est fortement suggéré mais non démontré au plan expérimental. De plus, le rôle de NF- $\kappa$ B dans la lymphomagenèse MYC-dépendante mérite d'être éclairci compte tenu des nombreux travaux de la littérature indiquant que MYC et NF- $\kappa$ B sont incompatibles dans la pathologie du lymphome de Burkitt (Hummel *et al.*, 2006 ; Klapproth *et al.*, 2009 ; Keller *et al.*, 2010). Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'EBV, au travers de la latence III et de sa cible NF- $\kappa$ B, coopère avec MYC aux étapes précoces du développement tumoral dans le lymphome de Burkitt.

Les plus fortes surexpressions de MYC correspondent aux cas les plus agressifs et les plus résistants aux thérapeutiques standards des DLBCL. Environ 50% des DLBCL sont de phénotype B-activé post-centre germinatif ou ABC. Ces lymphomes sont associés à une dérégulation de la voie NF- $\kappa$ B indispensable à leur survie/prolifération et sont de plus mauvais pronostic. L'activation constitutive de NF- $\kappa$ B est très probablement un événement oncogénique majeur étant donné d'une part, l'addiction des cellules tumorales à NF- $\kappa$ B et d'autre part, la récurrence des anomalies retrouvées sur cette voie. Nous faisons donc l'hypothèse que l'activation constitutive et simultanée des facteurs NF- $\kappa$ B et MYC est responsable des DLBCL de type ABC.

L'objectif global de mon travail de thèse est de tester la coopération entre MYC et NF- $\kappa$ B, dans deux modèles distincts de lymphomes B agressifs : le lymphome de Burkitt et les DLBCL de type ABC.

Les différents objectifs de ce travail étaient :

- ✓ D'apporter les arguments expérimentaux pour la mise en évidence d'un modèle de coopération entre l'expression transitoire de la latence III/NF- $\kappa$ B de l'EBV et MYC dans les étapes précoces de la lymphomagenèse associée au lymphome de Burkitt ;
- ✓ De tester le rôle d'une stimulation antigénique chronique via les TLR/NF- $\kappa$ B dans le lymphome de Burkitt ;
- ✓ De créer un modèle murin de DLBCL de type ABC sur la base d'une coopération entre une activation constitutive et permanente de NF- $\kappa$ B et MYC.



# **Chapitre III**

## **Résultats**





**Partie 1**  
**Manuscrit soumis**

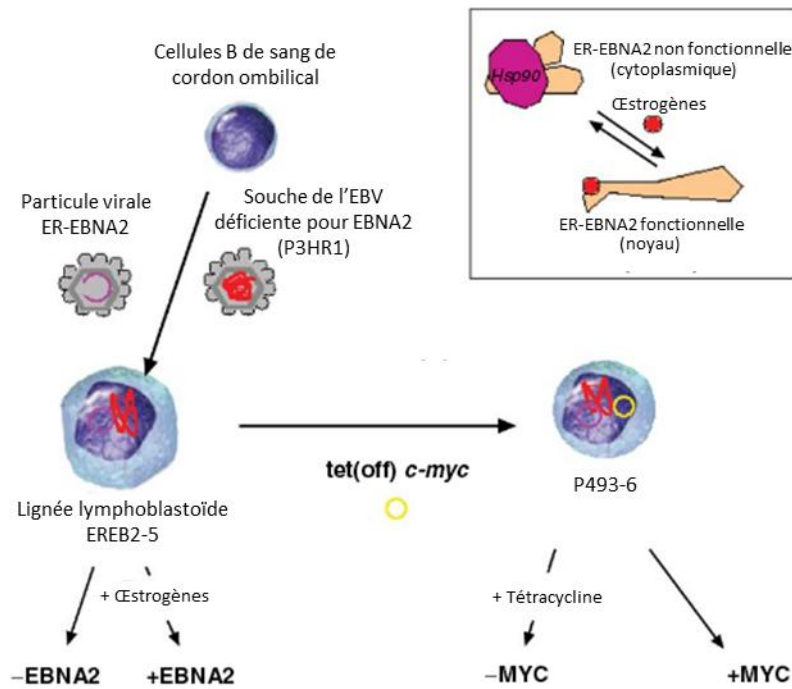


## Partie 1 : Manuscrit en révision

### **NF- $\kappa$ B Activation by Epstein-Barr Virus Infection Promotes MYC-dependant Lymphomagenesis in Early Phases of Burkitt's Lymphomas.**

Amandine David, Magalie Fradet, Nathalie Gachard, Jean Feuillard, and Nathalie Faumont.

Comme dit précédemment, le rôle de l'EBV dans la genèse du lymphome de Burkitt est fortement suggéré mais non démontré. La physiopathologie de l'infection des cellules B par l'EBV suggère que la latence III de l'EBV (expression de l'ensemble des protéines virales) est réprimée dans le lymphome de Burkitt pour aboutir à la seule expression de la protéine de latence I, EBNA1. Dans le but de comprendre les interactions entre l'EBV et MYC dans la pathogenèse du Burkitt, nous souhaitons modéliser *in vitro* cette conversion entre les programmes de Latence de l'EBV. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée B humaine P493-6 (Pajic et al 2000) (Figure 1). Ces cellules sont doubles inductibles, d'une part pour le programme de latence III de l'EBV par ajout d'œstradiol dans le milieu de culture et d'autre part pour MYC dont l'expression est régulée par la tétracycline dans un système Tet-off.



**Figure 1 : Description des modèles cellulaires EREB2-5 et P493-6.**

Les cellules EREB2-5 correspondent à des lymphocytes B provenant de sang de cordon ombilical co-infectés par une souche de l'EBV déficiente pour EBNA2 (souche P3HR1) et par une particule virale contenant un mini génome EBV exprimant une protéine EBNA2 fusionnée au récepteur aux œstrogènes. L'ajout d'œstradiol dans le milieu de culture permet de rendre la protéine EBNA2 active conduisant à l'expression d'une latence III.

Les cellules P493-6 sont obtenues par transfection des EREB2-5 avec le gène MYC dont l'expression est régulable par la tétracycline dans un système Tet-off. (Modifié d'après Schlee et al., 2007b).

Nos résultats montrent que la répression de MYC entraîne une augmentation de l'expression des protéines de la latence III de l'EBV notamment EBNA2 et LMP1, alors que l'expression d'EBNA1, caractéristique de la latence I, reste constante. De plus, nos approches de surexpression ou d'inhibition de MYC dans des modèles B humains normaux ou tumoraux (LB) infectés par l'EBV, montrent que MYC exerce son effet répresseur uniquement lorsqu'il est surexprimé. La culture des cellules P493-6, pendant 3 semaines, en présence de la surexpression de MYC et de la latence III de l'EBV montre que la surexpression continue de MYC abolit complètement l'expression d'EBNA2 et LMP1 dès le 10<sup>ième</sup> jour. Seule l'expression d'EBNA1 est maintenue.

Le répresseur transcriptionnel CTCF (*CCCTC-binding factor*) est une cible de MYC et un répresseur transcriptionnel des gènes EBNA dont EBNA2 (Chau et al., 2006). Nos expériences d'inhibition de CTCF suggèrent que la répression de la latence III de l'EBV par MYC implique CTCF.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que MYC réprime le programme de latence III de l'EBV et induit le « *switch* » vers la latence I, donnant une première clé de compréhension de la relation entre le lymphome de Burkitt et l'EBV.

L'étude d'une coopération effective entre MYC et la latence III de l'EBV a révélé que les plus hauts niveaux de prolifération corrélés à une apoptose réduite sont obtenus lorsque les deux programmes sont induits simultanément.

Enfin, l'étude de l'implication des voies de signalisation induites par LMP1 potentiellement impliquées dans la synergie d'action observée (ERK, AKT, et NF- $\kappa$ B) a révélé que malgré la baisse d'expression de LMP1 par MYC, seule la voie NF- $\kappa$ B est encore suractivée en présence de la latence III de l'EBV et MYC par rapport à MYC seul. L'inhibition de NF- $\kappa$ B diminue la prolifération cellulaire suggérant son implication dans l'effet coopératif observé.

Comme deuxième élément de compréhension du lymphome de Burkitt, ces résultats suggèrent que la lymphomagenèse est favorisée aux stades précoces par l'activation du facteur NF- $\kappa$ B lors de la latence III de l'EBV, potentialisant l'effet transformant de MYC.

Enfin dans le but de valider *in vivo* notre modèle de coopération entre NF- $\kappa$ B et MYC, nous avons utilisé le modèle transgénique  $\lambda$ c-MYC où le gène *MYC* est placé sous le contrôle des séquences régulatrices du locus de la chaîne légère lambda des immunoglobulines. Nos résultats indiquent qu'un signal TLR9, inducteur de la voie NF- $\kappa$ B, augmente l'effet transformant de MYC uniquement dans les stades précoces de la lymphomagenèse associée à MYC.

**Partie 2**

**Résultats complémentaires**

**Xénogreffe de la lignée P493-6**



## Partie 2 : Résultats complémentaires

### Xénogreffe de la lignée P493-6

Nos résultats concernant l'étude de la prolifération et de l'apoptose de la lignée P493-6 nous ont permis de mettre en évidence une prolifération et une survie Maximales en présence des deux programmes MYC et la latence III de l'EBV (*cf.* Résultats Partie 1).

Dans le but de consolider ces résultats par une approche *in vivo*, nous avons réalisé des expériences de xénogreffes des différentes conditions des cellules P493-6 : MYC dans un contexte d'EBV-latence I ou d'EBV-latence III et la latence III de l'EBV seule.

#### I. Matériels et méthodes

##### 1. Xénogreffes des cellules P493-6 aux souris SCID (*severe combined immunodeficiency*)

Vingt-quatre heures avant les xénogreffes, les cellules P493.6 sont cultivées en présence ou en absence d'œstradiol pour l'expression ou la répression des protéines de latence III de l'EBV respectivement et/ou en présence ou en absence de Tétracycline pour la répression ou l'expression de MYC respectivement. Les quatre conditions suivantes sont obtenues : MYC seul, pas de programme de prolifération *i.e.* état quiescent, MYC + EBV-Latence III, et EBV-Latence III seule. Les souris SCID sont anesthésiées avec un mélange de Xylazine (1 mg/mL) et de Kétamine (10 mg/mL) à raison de 100 µL/10 g. Les anesthésiants sont injectés en intra-péritonéal, puis 10 millions de cellules (contenues dans 50 µl de sérum physiologique 0,9% NaCl) sont injectées en sous-cutané au niveau du flanc des souris. Pour maintenir au cours du temps l'expression des protéines virales de la latence III, 1 mg de Tamoxifène (Sigma-Aldrich ; solution à 10 mg/mL dans 10% d'éthanol et 90% d'huile de tournesol) est injecté en intra-péritonéal. Cet anti-estrogène utilisé en thérapie anti-cancéreuse, se fixe au récepteur d'œstrogène fusionné à la protéine EBNA2 permettant l'expression des protéines virales de la latence III. Quant à la répression de MYC, elle est maintenue par injection également en intra-péritonéal de 10 µg de Doxycycline. La fréquence des injections intra-péritonéales est



de deux fois par semaine. Le volume de la tumeur est suivi dans le temps. Quatre xénogreffes sont réalisées par conditions de cellules P493.6

## 2. Caractérisation des tumeurs développées chez les souris SCID

Après dissection, la rate et les tumeurs développées sur les souris SCID sont prélevées, puis broyées sur un tamis de 70  $\mu$ M afin d'isoler les cellules. Ces dernières sont reprises dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 1% de sérum de veau fœtal (SVF), 0.12% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1% d'acides aminés non essentiels, 1 mM de pyruvate, 2 mM de L-glutamine, 50 U.I./mL de pénicilline et 50 mg/mL de streptomycine. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm à 4°C puis reprises dans un tampon de lyse des globules rouges (e-Biosciences ; Red Blood Cell Lysis Buffer) pendant 3 minutes. L'arrêt de la lyse se fait par ajout de 5 mL de milieu complet 1% SVF dans la glace. Les cellules sont alors centrifugées à nouveau pendant 10 minutes à 1000 rpm à 4°C, puis le culot est repris dans du milieu complet 1% SVF.

Les immunomarquages sont réalisés sur 500 000 cellules dans du tampon MACS (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA ; Miltenyl-Biotech.) avec un anticorps anti-CD20 humain couplé à la PE (Beckman Coulter). Les cellules sont ensuite lavées avec 2 mL de tampon MACS, puis reprises dans 300  $\mu$ L de ce même tampon pour l'analyse par cytométrie en flux (FACS Calibur ; Becton Dickinson). La viabilité est estimée par addition du TO-PRO<sup>®</sup>-3 (1/2 000<sup>ième</sup> ; 0,5 $\mu$ M).

## 3. Extraction et immunodétection des protéines par Western-blot

Après deux lavages dans du PBS froid, 10 millions de cellules sont reprises dans 100  $\mu$ L d'un tampon de lyse RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay ; BioRad) additionné d'inhibiteurs de protéases pour conserver les protéines intactes : 200 mM PMSF (Fluorure d'alpha-phényl méthyl sulfonyle, inhibiteur des sérines protéases), 100 mM d'orthovanadate de sodium et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Santa-Cruz Biotech.). La lyse est réalisée à 4°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation à 10 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré et le dosage des protéines réalisé par la méthode Bradford.

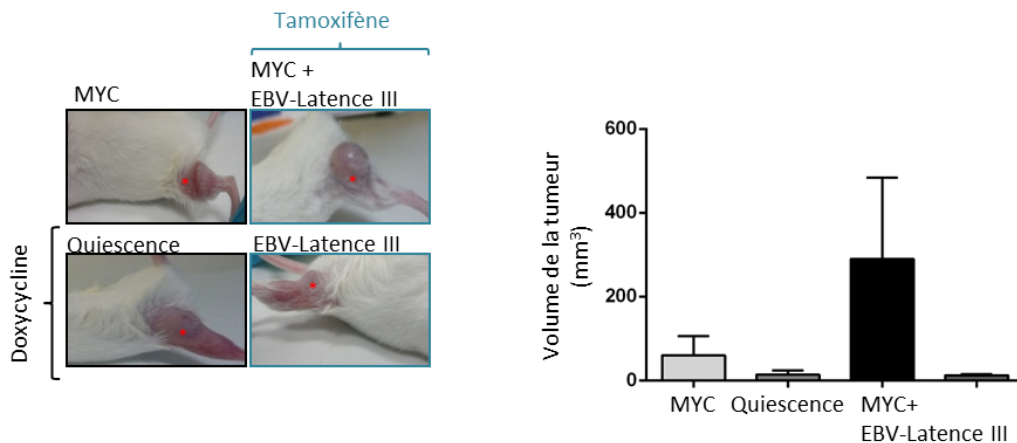
Les protéines (20  $\mu$ g) sont déposées sur gel de SDS-polyacrylamide à 8%. En parallèle 10  $\mu$ L de marqueur de masse moléculaire (Fermentas) sont déposés dans l'un des puits. La migration est réalisée à 300 V et 60 mA pendant 90 minutes dans du tampon de migration

(Tris 54 mM/Glycine 150 mM, pH 8,8). Les protéines sont ensuite électro-transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene Fluoride) entre des couches de papier Whatman imbibées de tampon de transfert (Tris 25 mM/Glycine 92 mM, pH 8,8). Le transfert des protéines s'effectue à 25 V-1 A pendant 30 minutes grâce à l'appareil TransBlot turbo (BioRad). La saturation des sites non spécifiques sur la membrane se fait pendant une heure à température ambiante dans une solution de TTBS composée de TBS (*Tris Buffered Saline*, Bio-Rad) et de 0,1% Tween-20 (Bio-Rad), additionnée de 5% de lait entier (Merck). Les anticorps primaires dilués dans du TTBS-3% lait sont alors incubés à 4°C sur la nuit : anti-MYC (1/200<sup>ième</sup> ; clone 9E10 donné pour reconnaître les formes humaine et murine de MYC ; Santa-Cruz Biotech.), anti-LMP1 (1/200 ; clone S12) et anti- $\alpha$ Tubuline (1/1 0000 ; clone B-5-1-2 capable de reconnaître les formes humaine et murine de l' $\alpha$ Tubuline ; Sigma-Aldrich). Après trois lavages en TTBS, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire (*Goat anti-mouse* couplé à l'HRP : *HorseRadish Peroxydase*) au 1/5 000 dans du TTBS-5% lait. Après lavages, la membrane est mise en présence de luminol (Pierce ECL ; Western Blotting Substrate) pendant quelques minutes. La peroxydase couplée aux anticorps secondaires provoque l'oxydation de son substrat en un composé instable qui en redevenant stable émet de la lumière. Cette chimiluminescence est détectée grâce à l'exposition d'un film photosensible. La quantité de protéines déposées est vérifiée grâce à la protéine  $\alpha$ Tubuline.

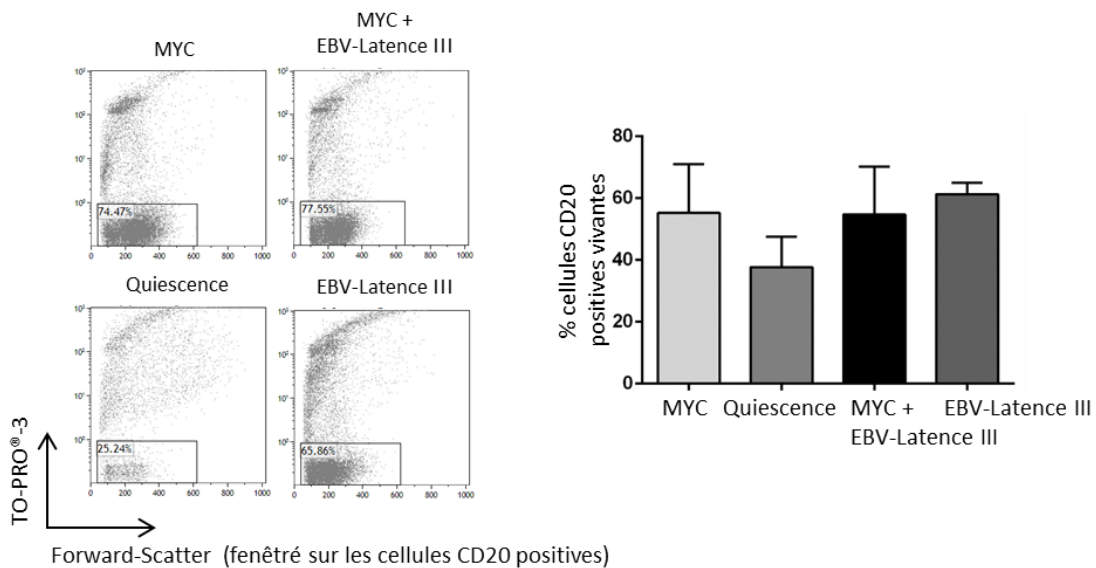
## II. Résultats

Les xénogreffes des cellules P493-6 aux souris SCID montrent une augmentation du volume de la tumeur en présence de la latence III de l'EBV et MYC au bout de 21 jours : soit en moyenne 290 mm<sup>3</sup> contre 12.6 mm<sup>3</sup> et 60.1 mm<sup>3</sup> pour EBV-latence III ou MYC seuls respectivement (Figure 1A). Notons le développement de tumeurs de faible volume (14.4 mm<sup>3</sup>) sous la condition « Quiescence ». Ce résultat suggère que l'expression conjointe et simultanée de MYC et de la latence III de l'EBV confère un avantage prolifératif *in vivo*.

A.



B.



**Figure 1 : La croissance tumorale in vivo est maximale en présence du programme de latence III de l'EBV plus MYC.**

Les cellules P493.6 sont cultivées selon quatre conditions : MYC seul, aucun programme i.e. Quiescence (ajout de Tétracycline), MYC + EBV-Latence III (ajout d'œstradiol), et EBV-Latence III seule (ajout d'œstradiol et Tétracycline). Les cellules ( $10 \times 10^6$ ) sont injectées aux souris SCID en sous-cutané 24 heures après l'induction des programmes de prolifération. Le Tamoxifène et la Doxycycline sont injectés en intra-péritonéal deux fois par semaine pour maintenir l'expression des protéines d'intérêt. **A.** Panel de gauche : photos représentatives des tumeurs (astérisque rouge) selon les quatre conditions de culture. Panel de droite: Volume moyen des tumeurs au bout de 21 jours. **B.** Pourcentage de cellules CD20-humain positives vivantes (TO-PRO<sup>®</sup>-3 négatives) dans les tumeurs développées sur les souris SCID. Panel de gauche : cytogrammes TO-PRO<sup>®</sup>-3/Forward-Scatter fenêtré sur les cellules CD20 positives. Panel de droite : pourcentages moyens de cellules CD20 positives vivantes selon les quatre conditions de culture.

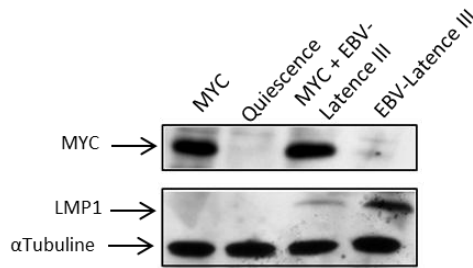
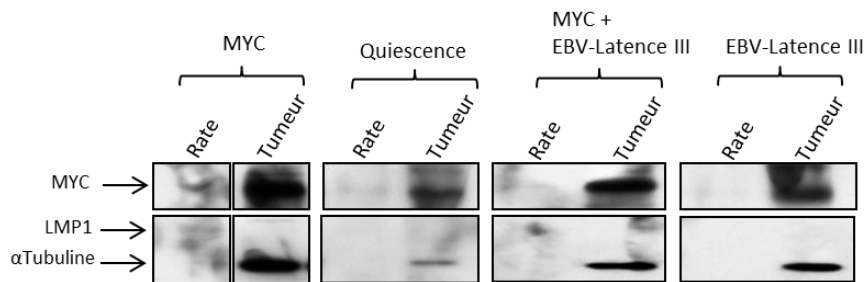
Nous avons ensuite déterminé le taux de survie des cellules P493-6 dans les tumeurs obtenues. Pour ce faire, nous avons réalisé un marquage à l'aide d'un anticorps anti-CD20 humain suivi d'un marquage des cellules mortes au TO-PRO<sup>®</sup>-3. Les splénocytes des souris greffées sont utilisés comme « contrôle négatif » de l'immunomarquage anti-CD20 (non-montré). Les résultats montrent que *i)* les différentes tumeurs développées sont bien constituées de cellules exprimant le CD20 humain, et *ii)* le taux de survie de ces cellules au

sein de la tumeur n'est pas différent selon les conditions MYC seul, EBV-latence III seule et MYC plus EBV-latence III (Figure 1B). Ce pourcentage est diminué dans la condition « Quiescence ».

Enfin, nous avons recherché l'expression de LMP1 pour valider l'expression de la latence III de l'EBV et également celle de MYC dans les cellules P493-6 avant injection et dans les tumeurs. Avant xénogreffe, l'expression de MYC est réprimée par la Tétracycline (*i.e.* conditions « Quiescence » et EBV-latence III seule) et l'expression de LMP1 est induite en réponse à l'œstradiol (*i.e.* conditions MYC + EBV-latence III et EBV-latence III seule) (Figure 2A). La Figure 2B montre l'expression de MYC et LMP1 dans les tumeurs. Elles surexpriment toutes MYC, y compris celles développées chez les souris SCID ayant reçu des injections de Doxycycline pour réprimer l'expression de MYC (*i.e.* les conditions « Quiescence », et EBV-Latence III seule). Ce niveau d'expression est comparé par rapport à la faible expression de MYC dans les splénocytes des souris SCID injectées. L'expression de LMP1 n'est détectée dans aucune des tumeurs, pas même dans celles en provenance des souris SCID ayant reçu des injections de Tamoxifène pour induire la latence III de l'EBV (*i.e.* les conditions MYC + EBV-latence III, et EBV-latence III seule). L'absence de détection de l' $\alpha$ Tubuline dans les splénocytes murins est due à une non-détection de la forme murine de l' $\alpha$ Tubuline par l'anticorps utilisé (bien que donné pour la reconnaître). En effet, ce résultat a été constaté lors d'autres expériences nécessitant la révélation de cette protéine à partir d'extraits murins.

**A.**

Cellules P493-6 avant injection: les 4 conditions de culture

**B.**

**Figure 2 :** Analyse de l'expression des protéines MYC et LMP1 dans les cellules P493-6 avant xéno greffe et dans les tumeurs développées par les souris SCID.

Les cellules P493.6 sont cultivées selon quatre conditions : MYC seul, aucun programme i.e. Quiescence (ajout de Tétracycline), MYC + EBV-Latence III (ajout d'œstradiol), et EBV-Latence III seule (ajout d'œstradiol et Tétracycline). Analyse de l'expression de MYC, LMP1, et  $\alpha$ Tubuline par Western-blot dans les P493-6 avant xéno greffe (A.) et dans la tumeur (B.). Dans le panel B, des extraits protéiques de splénocytes sont utilisés comme contrôle d'expression. 20  $\mu$ L d'extrait ( $1 \times 10^6$  cellules) sont déposées par piste. La révélation de l' $\alpha$ Tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

### III. Discussion, perspectives et conclusions

Ces résultats *in vivo* sont en cohérence avec ceux présentés en Figure 3 du Manuscrit « NF- $\kappa$ B Activation by Epstein-Barr Virus Infection Promotes MYC-dependant Lymphomagenesis in early phases of Burkitt's Lymphomas. » (cf. Résultats Partie 1). En présence des deux programmes MYC et la latence III de l'EBV, nous observons une augmentation de la croissance tumorale chez la souris SCID.

Contrairement aux cellules xéno greffées et malgré l'injection continue de Tamoxifène visant à maintenir l'expression du programme de latence III de l'EBV, les tumeurs n'expriment plus LMP1 au 21<sup>ème</sup> jour. Ce résultat est très probablement à mettre en relation avec la répression de la latence III par MYC observée *in vitro* dès le 10<sup>ème</sup> jour de culture (cf. Figure 1 de l'article présenté en Partie 1 des résultats). Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution car nous ne pouvons pas exclure une inefficacité d'action du Tamoxifène *in vivo* ce

qui conduirait à l'extinction du programme de latence III de l'EBV au sein des cellules P493-6 injectées.

La croissance *in vivo* des cellules P493-6 sous la condition « Quiescence » s'explique probablement par l'expression de MYC dans les tumeurs correspondantes. Ce constat pose le problème de l'efficacité d'action de la Doxycycline au long terme sur les cellules P493-6. En effet, des expériences *in vitro* de culture continue en présence de Tétracycline montrent que l'expression de MYC n'est plus réprimée dès le 16<sup>ième</sup> jour (résultats non montrés). Bien que non-expliquée, cette observation pourrait expliquer la ré-expression de MYC dans les tumeurs issues des deux conditions traitées avec la Tétracycline : « Quiescence » et « EBV-latence III seule ».

Les résultats présentés ici sont le fruit d'une seule expérience que nous avons tenté de reproduire. Malheureusement, les cellules p493-6 avaient dérivé : diminution de l'effet de la Tétracycline (répression de MYC) et de l'œstradiol (induction du programme de latence III de l'EBV). En conclusion, bien que ces expériences de xéno greffe semblent confirmer nos résultats *in vitro*, nous devons les reproduire avec les cellules d'origine.

Pour valider l'efficacité du Tamoxifène *in vivo* et apprécier la croissance tumorale sous l'effet de l'EBV-Latence III seule, nous grefferons les cellules EREB2-5 aux souris SCID (Kempkes *et al.*, 1995). Ces cellules, dont dérivent les P493-6, sont des lymphocytes B co-infectés par une souche de l'EBV déficiente en EBNA2 (P3HR1) et par une particule virale contenant un mini génome EBV exprimant une protéine EBNA2 fusionnée au récepteur aux œstrogènes. L'injection sous-cutanée d'ERE2-5 suivie d'injections intra-péritonéales de Tamoxifène au cours du temps devrait permettre le développement de tumeurs dépendantes uniquement de la latence III de l'EBV.



## **Partie 3**

### **Résultats préliminaires**

**Etude du rôle du TLR9 dans la  
lymphomagenèse dépendante de  
c-Myc du lymphome de Burkitt**





## Partie 3 : Résultats préliminaires

### Etude du rôle du TLR9 dans la lymphomagenèse dépendante de MYC du lymphome de Burkitt

#### I. Introduction

##### 1. Présentation générale des Toll-like récepteurs ou TLR

La protéine transmembranaire Toll a d'abord été découverte chez la Drosophile en 1988 pour son rôle dans le développement embryonnaire (Hashimoto *et al.*, 1988). Des drosophiles déficientes en Toll présentent une sensibilité accrue aux infections fongiques mettant ainsi en évidence le rôle de cette protéine dans l'immunité (Lemaitre *et al.*, 1996).

La recherche de molécules homologues à Toll chez les mammifères a conduit à l'identification d'une famille de molécules apparentées, les Toll-like récepteurs (TLR).

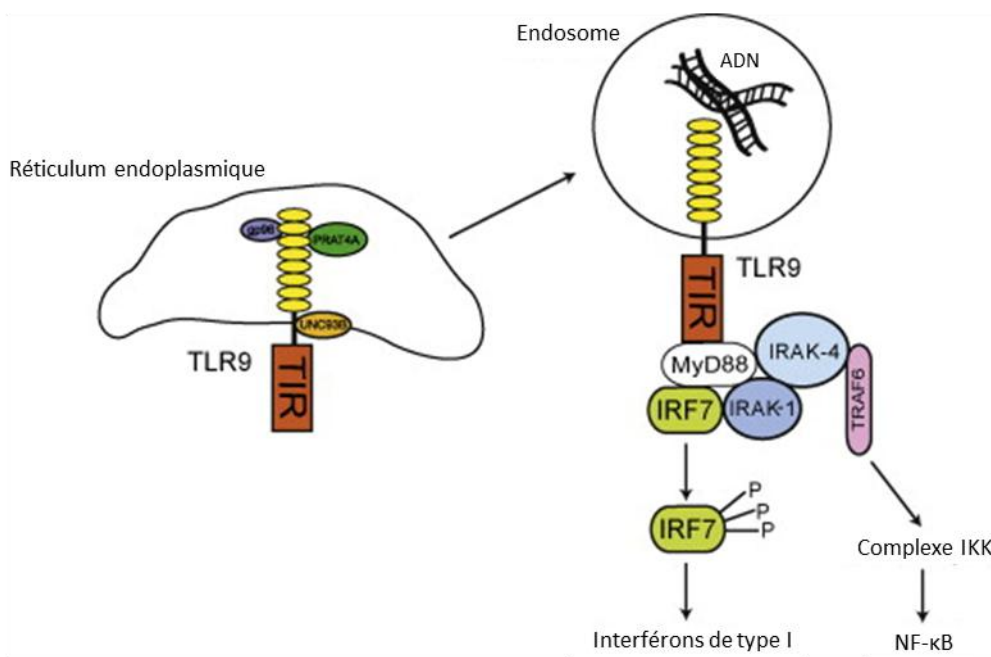
Les TLR sont des récepteurs de l'immunité innée et font partie de la famille la mieux connue de PRR (*Pattern Recognition Receptor*). Ils reconnaissent une grande variété de structures moléculaires microbiennes hautement conservées regroupées sous le terme de PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) (Chiron *et al.*, 2008). Les TLR peuvent également être activés en réponse à des molécules du soi produites lors d'altérations des tissus regroupées sous le terme de DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*) telles que la protéine HSP70 ou encore la fibronectine (Asea *et al.*, 2002 ; Okamura *et al.*, 2001). Ainsi, de manière générale, les TLR génèrent un signal de danger nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les TLR se situent donc à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative (Matzinger, 2002 ; Delneste *et al.*, 2007).

## 2. TLR9 : de la réponse innée vers la réponse adaptative

### 2.1 Signalisation du TLR9 : activation de NF- $\kappa$ B

Le TLR9 reconnaît exclusivement les motifs CpG non-méthylés de l'ADN double brin de pathogènes.

Le TLR9 est présent au niveau du réticulum endoplasmique puis est transloqué vers les endosomes des cellules de l'immunité, essentiellement les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B, lorsqu'elles sont stimulées (Henault *et al.*, 2005). La relocalisation du TLR9 dans les endosomes s'accompagne d'un clivage protéolytique dans son domaine carboxy-terminal (Figure 1).



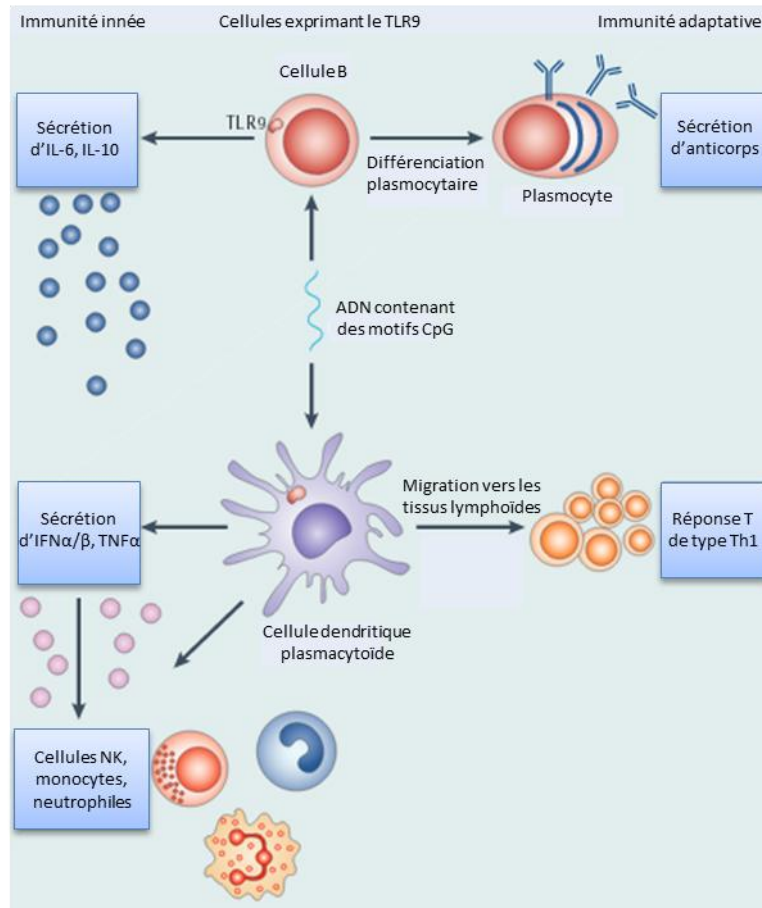
#### **Figure 1 : La signalisation du TLR9.**

Le TLR9 est situé dans le réticulum endoplasmique et est transloqué dans les endosomes où il subit un clivage protéolytique par des protéases endosomales telle que la Cathepsine. La translocation depuis le réticulum endoplasmique nécessite les protéines UNC93B1, gp96 et PRAT4A. Les motifs CpG des ADN exogènes se font endocyter aléatoirement par la cellule. Ils vont alors être reconnus par le TLR9 clivé présents dans ces endosomes. Le TLR9 va alors être activé ce qui va déclencher sa cascade de signalisation. Le domaine TIR (Toll/IL1-R domain) du TLR9 recrute la protéine adaptatrice MYD88 qui permet le recrutement et l'activation des kinases IRAK1/4 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase). IRAK4 permet ensuite le recrutement de TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) puis l'activation de TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$ -Activated Kinase 1) pour l'activation du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase) qui permet la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ Ba qui va alors libérer NF- $\kappa$ B lui permettant de passer dans le noyau pour activer ses gènes cibles (par exemple des cytokines pro-inflammatoires et des molécules de co-stimulation). Le TLR9 active également le facteur IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7) qui permet l'expression des interférons de type I. (modifié d'après Vilaysane et Muruve, 2009).

Quand les cellules sont activées, la forme clivée du TLR9 est donc augmentée (Bourke *et al.*, 2003). Le récepteur clivé est alors capable de reconnaître des ADN double brins exogènes. La fixation des motifs CpG au TLR9 conduit à sa trimérisation et au recrutement de la molécule adaptatrice MYD88 qui permet l'activation des kinases IRAK-1 et 4 (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*). Ces dernières vont activer à leur tour le facteur TRAF6 qui recrute la kinase TAK1 (*Transforming growth factor  $\beta$  Activated Kinase 1*) permettant l'activation du complexe IKK (*I $\kappa$ B kinase*). Enfin, ce complexe va phosphoryler l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  permet la libération des complexes NF- $\kappa$ B de la voie classique (impliquant RelA, c-Rel et p50) qui vont être transloqués dans le noyau et y activer des gènes cibles tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12) ou des molécules de co-stimulation [CD40, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86)] (Huang and Yang, 2010). Dans les cellules dendritiques, via MYD88/TRAF6, le TLR9 active aussi le facteur IRF7 (*Interferon Responsive Factor 7*) et en conséquence la production d'interférons de type I (INF $\alpha$  et  $\beta$ ).

## 2.2 Le TLR9 à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative

La voie de signalisation induite par le TLR9 joue un rôle important dans l'initiation de la réponse immune adaptative en réponse aux infections. Les cellules dendritiques activées par le TLR9 stimulent, grâce à la production d'interférons de type I, de cytokines pro-inflammatoires et/ou de molécules de co-stimulation, *i*) l'activation des lymphocytes Th1 et T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, *ii*) l'activité cytotoxique des cellules NK qui produisent alors de l'IFN $\gamma$ , et *iii*) la prolifération et la survie des lymphocytes B (Rothenfusser *et al.*, 2004 ; pour revue : Krieg, 2006). La stimulation du TLR9 induit la différenciation terminale des lymphocytes B naïfs ou mémoires en plasmocytes mais n'affecte pas la génération de cellules B mémoires (Jung *et al.*, 2002) (Figure 2).



**Figure 2 : Le TLR9 à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative.**

La signalisation induite par le TLR9 (Toll-Like Receptor 9) joue un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative en réponse aux infections. Le TLR9 est préférentiellement exprimé au niveau des cellules B et des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les cellules B activées par la stimulation TLR9 présentent une sensibilité augmentée pour la stimulation antigénique, favorisant ainsi leur différenciation en plasmocytes qui vont alors participer à la réponse adaptative. Les cellules dendritiques activées par le TLR9 stimulent, grâce à la production d'interférons de type I (IFN) et de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des lymphocytes Th1 et l'activité cytotoxique des cellules NK (Natural Killer). (modifié d'après Krieg, 2006).

### 3. TLR9 : une cible thérapeutique pour le traitement des lymphomes B ?

Compte tenu du profil d'expression du TLR9 au niveau des cellules tumorales et de sa capacité à stimuler la réponse immunitaire innée et adaptative, il apparaît comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des lymphomes B. Depuis plusieurs années, des oligodésoxynucléotides contenant des motifs CpG non-méthylés font l'objet d'essais cliniques dans le traitement des cancers dont les lymphomes B non-Hodgkiniens (Weiner, 2000). En association avec les thérapies anti-cancéreuses classiques (radiothérapie et chimiothérapie), la stimulation du TLR9 permet de promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant la stimulation du TLR9 conduit à des réponses hétérogènes des cellules B tumorales en fonction du type de lymphomes B (Jahrsdorfer *et al.*, 2005). En effet, dans certains cas, la stimulation du TLR9 ne conduit pas à la régression tumorale. Des travaux ont mis en évidence une

augmentation de la prolifération et un échappement au système immunitaire de cellules tumorales issues de lymphomes folliculaires ou de lymphomes de la zone marginale (Decker *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2005). Les effets de la stimulation du TLR9 ne sont donc pas prédictibles suivant le type de lymphomes B.

#### 4. TLR9 et lymphome de Burkitt

En Afrique équatoriale, le lymphome de Burkitt est associé dans près de 100% des cas à une stimulation chronique de l'immunité innée par l'EBV et *Plasmodium falciparum* (agent causal de la malaria). Dans ce lymphome, le TLR9 est surexprimé et fortement stimulé puisque c'est entre autre par cette voie que sont reconnus l'EBV ou le parasite (Gowda *et al.*, 2012 ; Ning *et al.*, 2011 ; Henault *et al.*, 2005). La stimulation du TLR9 dans des lignées de lymphome de Burkitt est connu pour bloquer l'induction du cycle productif de l'EBV (Zauner *et al.*, 2010 ; van Gent *et al.*, 2011), suggérant que le TLR9 pourrait augmenter le pouvoir oncogénique de l'EBV en maintenant l'état de latence du virus. De plus, un travail récent a montré que, selon le polymorphisme du TLR9, les lignées de lymphomes de Burkitt peuvent être activées ou mourir par apoptose après leur stimulation (Noack *et al.*, 2012). En conclusion, la stimulation du TLR9 dans le traitement des cas de lymphomes de Burkitt associés à l'EBV pourrait donc s'avérer plus délétère que bénéfique.

## II. Objectifs du travail

L'objectif de ce travail est de déterminer le rôle du TLR9 dans la lymphomagénèse du lymphome de Burkitt.

En effet, même s'il est clairement admis que la translocation de l'oncogène *MYC* est l'événement oncogénique majeur associé au développement du lymphome de Burkitt, d'autres processus y participent probablement. Parmi ceux-ci on trouve les infections par *i)* le parasite *Plasmodium falciparum*, *ii)* le VIH et/ou *iii)* l'EBV. Ces agents pathogènes sont connus pour induire une immunodépression (pour *Plasmodium falciparum* et le VIH) et pour stimuler la réponse immunitaire via le TLR9 (pour l'EBV et *Plasmodium falciparum*). Nous formulons l'hypothèse selon laquelle dans un contexte d'immunodépression (malaria ou VIH), la

stimulation des lymphocytes B par le TLR9, via les ADN viraux ou parasitaires, pourrait favoriser la croissance tumorale et le développement du lymphome de Burkitt.

Pour ce faire nous avons étudié l'effet *in vivo* et *ex vivo* de la stimulation TLR9 sur des lymphocytes B avec dérégulation de MYC :

Dans un premier temps, nos expériences ont consisté à stimuler *in vivo* le TLR9 de souris transgéniques  $\lambda$ c-MYC au stade pré-tumoral grâce à l'injection d'ODN-CpG (OligoDésoxyNucléotides contenant des motifs CpG).

Ensuite, nous avons isolé des lymphocytes B pré-tumoraux et tumoraux à partir de souris transgéniques  $\lambda$ c-MYC. Sur ces cellules, nous avons étudié, *ex vivo* et *in vivo* après xénogreffe aux souris SCID, l'effet de la stimulation TLR9 par des ODN-CpG.

### III. Matériels et Méthodes

#### 1. Modèles murins

Afin d'étudier l'implication du TLR9 dans le processus de cancérisation associée à MYC, nous avons travaillé sur le modèle transgénique  $\lambda$ c-MYC où le gène *MYC* est placé sous le contrôle des séquences régulatrices du locus de la chaîne légère lambda des immunoglobulines conduisant à sa surexpression constitutive dans les lymphocytes B (Kovalchuk et al. 2000). Ces souris développent des lymphomes de type Burkitt entre 9 et 20 semaines. Nous avons également utilisé le modèle murin  $\lambda$ c-MYC sous un fond génétique MYD88<sup>+/-</sup> hétérozygote : délétion du gène MYD88 sur un seul allèle (Adachi *et al.*, 1998).

Les expériences de xénogreffes sont réalisées sur des souris SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) qui ne possèdent ni lymphocytes B, ni lymphocytes T $\alpha\beta$  matures du fait d'une mutation qui altère le processus de recombinaison V(D)J dans la moelle osseuse.

#### 2. Stimulation du TLR9 et prolifération *in vivo*

Trois fois par semaine pendant deux semaines, des souris sauvages et  $\lambda$ c-MYC sont injectées en intra-péritonéal avec 50  $\mu$ g d'oligodésoxynucléotides contenant des motifs CpG (ODN-CpG) ou dépourvus de motifs CpG (ODN-Contrôle).

Vingt-quatre heures avant le sacrifice des souris, ces dernières reçoivent une injection de 2 mg de BrdU en intra-péritonéal. Après prélèvement de la rate et isolement des splénocytes, un marquage de la molécule BrdU est réalisé à l'aide d'un anticorps anti-BrdU couplé à la FITC (FITC BrdU Flow Kit ; BD Biosciences). L'ajout extemporanément d'iodure de propidium (IP) permet d'analyser le contenu en ADN des cellules.

### 3. Histologie de la rate de souris sauvage ou Igλ-MYC après stimulation du TLR9

Les rates prélevées sont fixées au Paraformaldéhyde puis l'inclusion en paraffine est réalisée par le service d'anatomopathologie du C.H.U. Dupuytren de Limoges. Sur des coupes de 5 µm préalablement déparaffinées, le tissu est coloré à l'Hématoxyline-Eosine.

### 4. Isolement des cellules murines et immunomarquages

Les cellules issues de la rate et des ganglions tumoraux sont isolées comme décrit dans les matériels et méthodes de la partie 2 des résultats. Le nombre de globules blancs extraits des organes et présents dans le sang est déterminé grâce à un compteur Cell-Dyn (ABBOTT).

Les immunomarquages sont réalisés sur 500 000 cellules dans du tampon MACS (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA ; Miltenyl-Biotech.) avec les anticorps suivants : anti-B220-FITC ou PerCP (1/200<sup>ème</sup>, clone RA3-6B2 ; Biolegend), anti-CD86-FITC (1/300<sup>ème</sup>, clone GL-1 ; Biolegend) et anti-IgM-PE (1/60<sup>ème</sup>, clone R6-60.2 ; BD Bioscience).

### 5. Stimulation cellulaire par des motifs CpG et étude de la prolifération *ex vivo*

Les cellules sont lavées avec du milieu complet sans SVF, puis le culot cellulaire est repris dans ce même milieu contenant 2,5 µM de CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester* ; Molecular Probes Invitrogen). L'incubation se fait à 37°C pendant 5 minutes. L'arrêt du marquage se fait par ajout de milieu complet 10% SVF froid et le tout est laissé incubé 5 minutes sur glace. Puis une centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm à 4°C est réalisée et les cellules sont lavées avec du milieu complet 10% SVF. Enfin, un comptage des cellules est réalisé



afin de les ensemercer à la concentration de 2,5 millions/mL sur une plaque 96 puits. Dans chaque puits, 2 µg/mL d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle sont rajoutés.

A 24 et 72 heures après le marquage au CFSE, les cellules sont lavées avec du tampon MACS (PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA ; Miltenyl-Biotech.). Le culot cellulaire est repris dans 200 µl de tampon MACS additionné de TO-PRO®-3 (1/2 000<sup>ème</sup> ; 0,5µM) avant l'analyse par cytométrie en flux.

## 6. Xénogreffes aux souris SCID

Les cellules sont stimulées pendant 3 heures en présence de 2 µg/mL d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle. Dix millions de ces cellules sont ensuite lavées deux fois dans du tampon MACS, puis le culot cellulaire est repris dans 50 µL de sérum physiologique 0,9% NaCl contenant 2 µg/mL d'ODN. Ces échantillons sont injectés aux souris SCID comme décrit dans les matériels et méthodes de la partie 2 des résultats. Puis 3 fois par semaine, le TLR9 est stimulé par des injections en intra-péritonéal d'ODN-CpG ou d'ODN-contrôle (50 µg).

## 7. Immunodétection des protéines par Western-blot

La méthodologie utilisée est décrite dans la partie 2 des résultats. Les anticorps utilisés sont l'anti-MYC (1/200<sup>ième</sup> ; clone 9E10, Santa Cruz), l'anti-TLR9 (1/100<sup>ième</sup>, clone 26C593.2 ; Imgenex), l'anti-TRAF-1 (1/200<sup>ième</sup>, clone N19 ; Santa Cruz) et l'anti-SAM68 (1/1 000<sup>ième</sup>, clone C-20 ; Santa Cruz). La quantité de protéines déposées est vérifiée grâce à la protéine SAM68.

# IV. Résultats

## 1. Effets de l'injection *in vivo* de motifs CpG chez des souris transgéniques λc-MYC

La caractérisation phénotypique des souris λc-MYC est présentée dans l'article « NF-κB Activation by Epstein-Barr Virus Infection Promotes MYC-dependant Lymphomagenesis in early phases of Burkitt's Lymphomas. » en Figure S5 (cf. Résultats Partie 1). Brièvement, les souris λc-

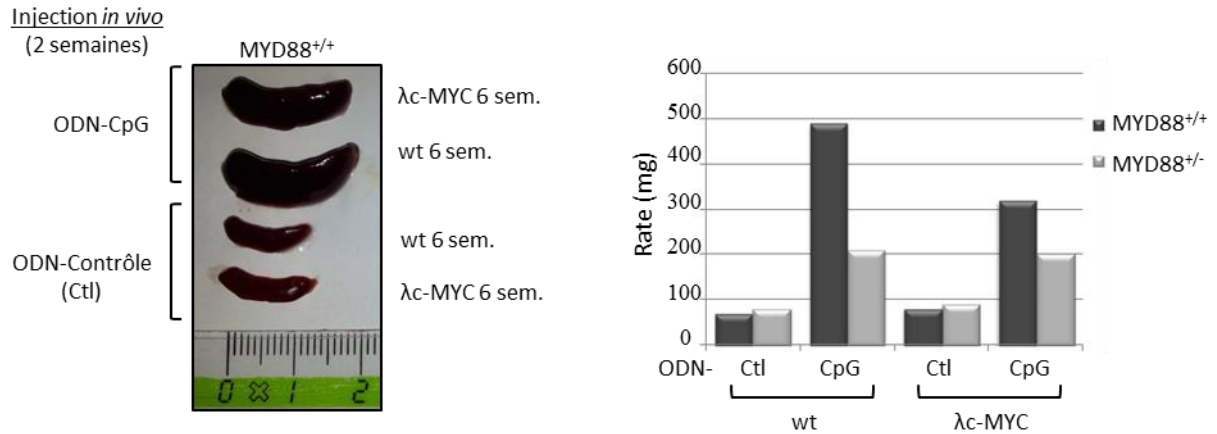
MYC présentent une splénomégalie, une augmentation du taux de globules blancs dans le sang, et également une augmentation du pourcentage de cellules B activées dans la rate. Notons que ces paramètres s'accroissent au cours du processus transformant. Quant au pourcentage de lymphocytes B dans la rate, il n'est pas changé au stade pré-tumoral et augmente significativement lorsque la tumeur est établie dans les ganglions lymphatiques.

Nos premières expériences afin d'étudier l'implication du TLR9 *in vivo* dans la lymphomagenèse du lymphome de Burkitt ont consisté à stimuler le TLR9 de souris sauvages et transgéniques  $\lambda$ c-MYC au stade pré-tumoral (âgées six semaines) grâce à l'injection, trois fois par semaine pendant deux semaines, d'ODN-Contrôle (absence de motifs CpG) ou d'ODN-CpG.

Les résultats indiquent que la stimulation du TLR9 grâce aux ODN-CpG provoque une augmentation de la taille et du poids de la rate aussi bien chez la souris sauvage que chez la souris  $\lambda$ c-MYC (Figure 3). Cependant, le poids de la rate de la souris  $\lambda$ c-MYC ayant reçu des injections d'ODN-CpG est inférieur ( $\approx 300$  mg) à celui de la rate de la souris sauvages pour les mêmes conditions d'injection ( $\approx 500$  mg).

Nous avons également réalisé cette expérience en utilisant des souris sauvages et  $\lambda$ c-MYC sous un fond génétique MYD88<sup>+/-</sup> hétérozygote afin de déterminer si la splénomégalie observée est dépendante de la stimulation du TLR9 *via* la protéine adaptatrice MYD88.

Nos résultats indiquent une augmentation moindre du poids de la rate en réponse à l'injection d'ODN-CpG chez les animaux hétérozygotes pour MYD88 par rapport aux souris MYD88 sauvages. Ceci est vrai aussi bien pour les souris sauvages que pour les souris  $\lambda$ c-MYC (Figure 3).



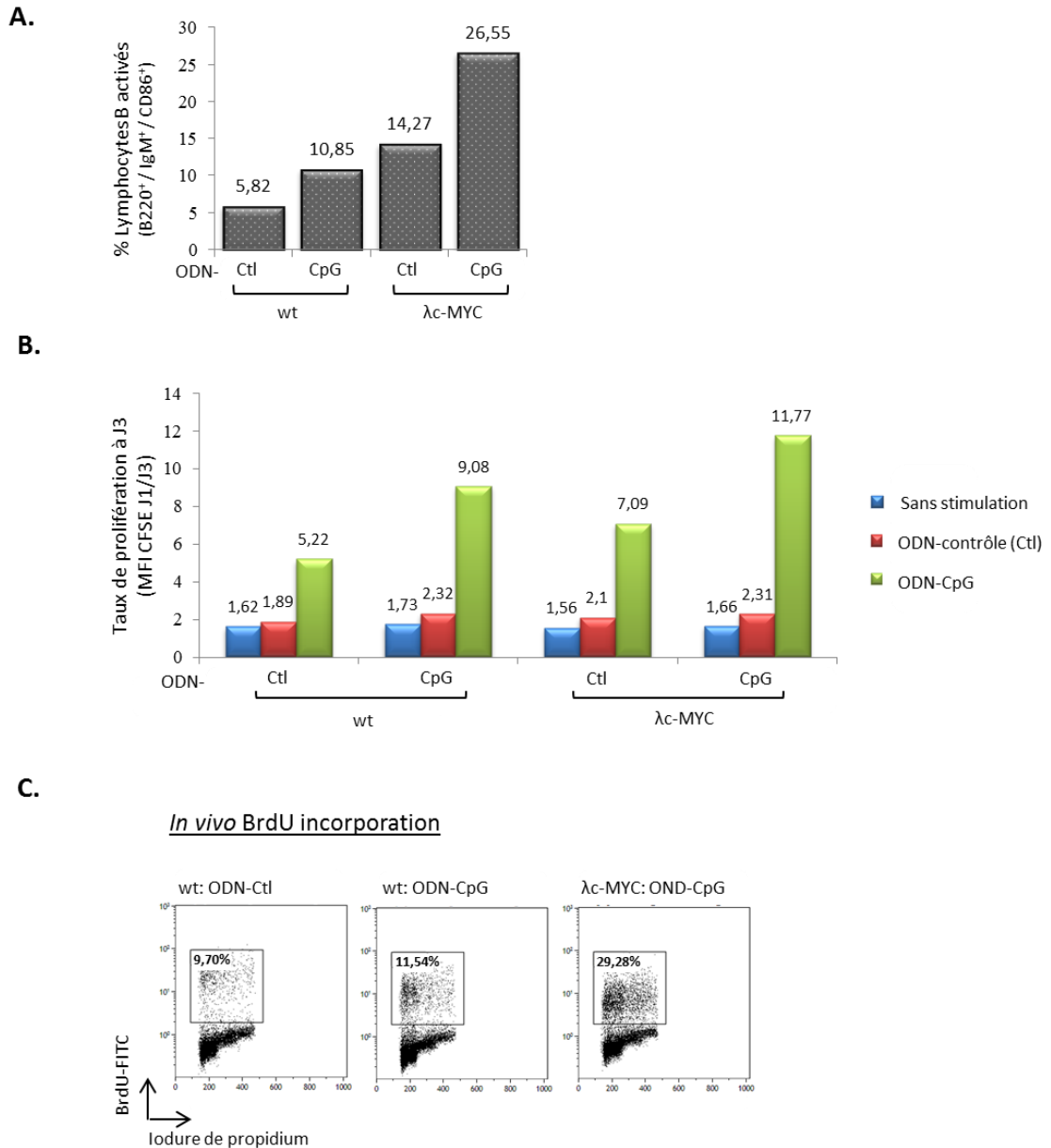
**Figure 3 :** Effets de la stimulation du TLR9 *in vivo* chez des souris transgéniques  $\lambda$ c-MYC pré-tumorales âgées de 6 semaines.

Trois fois par semaine, les TLR9 de souris contrôles/sauvages et de souris  $\lambda$ c-MYC ont été stimulés par des injections intrapéritonéales d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle. Nous avons également réalisé cette expérience avec des souris sauvages et  $\lambda$ c-MYC sous un fond génétique MYD88<sup>+/-</sup> hétérozygote. Au bout de quinze jours, les souris sont sacrifiées et les rates sont mesurées (panel de gauche) et pesées (panel de droite).

Ensuite, les splénocytes sont isolés puis caractérisés à l'aide d'un immunomarquage B220/CD86/IgM afin de déterminer le pourcentage de lymphocytes B activés. Ce pourcentage de cellules B activées est augmenté suite à la stimulation *in vivo* du TLR9 et ceci aussi bien chez la souris sauvage (5,82% avec les ODN-Contrôle contre 10,85% avec les ODN-CpG) que chez la souris  $\lambda$ c-MYC (14,27% avec les ODN-Contrôle contre 26,55% avec les ODN-CpG) (Figure 4A).

Ensuite, nous avons suivi la prolifération *ex vivo* des splénocytes sauvages et  $\lambda$ c-MYC caractérisés ci-dessus, mis en présence d'ODN-Contrôle ou d'ODN-CpG. La prolifération est étudiée grâce à la molécule fluorescente CFSE qui pénètre dans les cellules et dont l'intensité de fluorescence diminue lors de chaque cycle de division cellulaire.

Après trois jours de stimulation par les ODN-CpG, le taux de prolifération cellulaire est déterminé (Figure 4B). Pour la souris  $\lambda$ c-MYC, la stimulation *ex vivo* par les motifs CpG induit un taux de prolifération plus important des splénocytes par rapport aux cellules sauvages : 11,77 pour les splénocytes  $\lambda$ c-MYC contre 9,08 pour les splénocytes sauvages après stimulation *in vivo* par les ODN-CpG. Bien que les taux de prolifération soient moindres, cet effet est aussi observé lorsque les souris sont stimulées *in vivo* par les ODN-Contrôle : 7,09 pour les splénocytes  $\lambda$ c-MYC contre 5,22 pour les cellules sauvages.



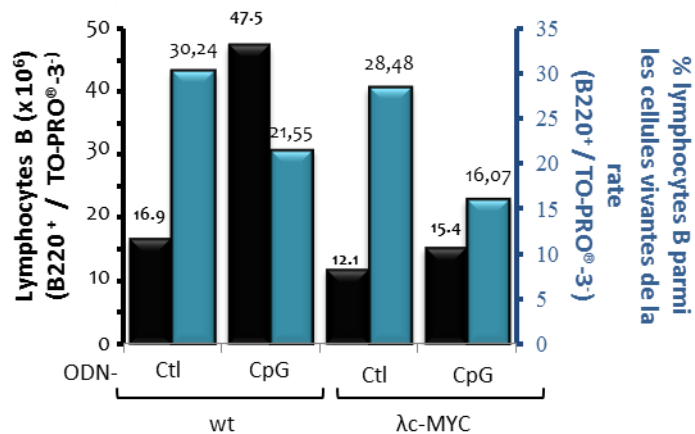
**Figure 4 : Effets de la stimulation du TLR9 sur l'activation des cellules B et la prolifération des splénocytes totaux chez des souris transgéniques λc-MYC.**

Trois fois par semaine, les TLR9 de souris contrôles/sauvages et de souris λc-MYC ont été stimulés par des injections intra-péritonéales d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle. Au bout de deux semaines, les souris sont sacrifiées. **A.** Les splénocytes sont isolés et le pourcentage de cellules B activées est déterminé : B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, et CD86<sup>+</sup>. **B.** Les splénocytes totaux sont stimulés ex vivo soit par i) des ODN-Contrôle (rouge), ii) des ODN-CpG (vert), ou iii) ne sont pas stimulés (bleu). L'histogramme représente le taux de prolifération des cellules à 3 jours de stimulation : rapport entre les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) du CFSE à J1 et J3 (MFI J1 / MFI J3). Sous l'histogramme sont indiquées les conditions de stimulation in vivo. **C.** Les souris sont injectés en intra-péritonéal avec 2 mg de BrdU. Après 24 heures, un marquage BrdU est réalisé sur les splénocytes grâce à un anticorps anti-BrdU couplé à la FITC. Les cytogrammes représentent la fluorescence émise par la FITC qui reflète l'incorporation de BrdU et le contenu en ADN grâce à l'iodure de propidium (IP). L'encadré indique le pourcentage de splénocytes en cycle pendant 24 heures. Sur les cytogrammes sont indiquées les conditions de stimulation in vivo.

Nous avons également suivi *in vivo* l'effet de la stimulation du TLR9 sur la prolifération des splénocytes de souris sauvages et λc-MYC au stade pré-tumoral. Pour ce faire, nous avons injecté en intra-péritonéal une solution de BrdU aux animaux stimulés ou non par des ODN-CpG

(Figure 4C). En 24 heures, nous observons 29,28% de cellules BrdU<sup>+</sup> chez la souris  $\lambda$ c-MYC contre 11,54% chez la souris sauvage. La stimulation *in vivo* du TLR9 entraîne donc une augmentation de la prolifération des splénocytes  $\lambda$ c-MYC comparée à celle des splénocytes sauvages.

L'injection *in vivo* d'ODN-CpG a pour effet d'augmenter l'activation et la prolifération des splénocytes  $\lambda$ c-MYC par rapport aux cellules sauvages mais sans pour autant augmenter la splénomégalie. Pour comprendre cette apparente contradiction, nous avons déterminé le pourcentage (histogramme bleu) et le nombre absolu (histogramme noir) de lymphocytes B vivants (B220<sup>+</sup> et TO-PRO<sup>®</sup>-3<sup>-</sup>) présents dans la rate. L'injection d'ODN-CpG entraîne une diminution du pourcentage de lymphocytes B aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris  $\lambda$ c-MYC (Figure 5).

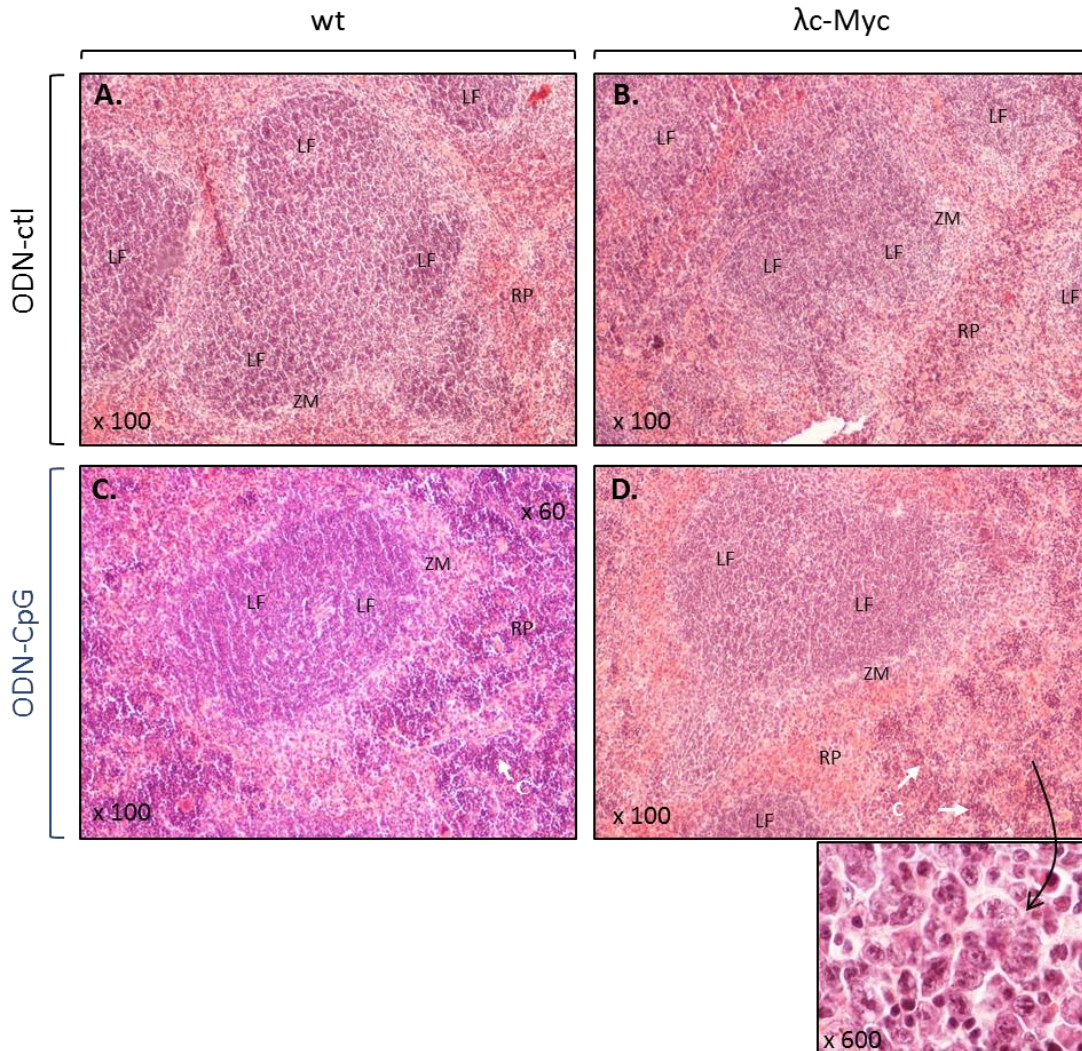


**Figure 5 : Effets de la stimulation du TLR9 *in vivo* sur le pourcentage et le nombre absolu de lymphocytes B présents dans la rate de souris transgéniques  $\lambda$ c-MYC.**

Trois fois par semaine, les TLR9 de souris contrôles/sauvages et de souris  $\lambda$ c-MYC ont été stimulés par des injections intrapéritonéales d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle. Au bout de quinze jours, les splénocytes sont isolés et marqués (B220/TO-PRO<sup>®</sup>-3) puis analysés par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage (histogramme bleu) et le nombre absolu (histogramme noir) de cellules B B220<sup>+</sup> parmi les cellules vivantes TO-PRO<sup>®</sup>-3<sup>-</sup>.

Le nombre absolu de lymphocytes B contenus dans la rate est fortement augmenté en réponse à une stimulation du TLR9 chez la souris sauvage : 16,9 millions de cellules B dans la rate de la souris recevant des ODN-Contrôle contre 47,5 millions de cellules B dans celle de l'animal recevant des injections d'ODN-CpG. Ce résultat n'est pas retrouvé chez la souris  $\lambda$ c-MYC : 12,1 millions de lymphocytes B dans la rate de la souris injectée avec des ODN-Contrôle contre 15,4 millions dans celle de la souris recevant des ODN-CpG (Figure 5). Ces données suggèrent que la splénomégalie induite par l'injection des ODN-CpG dans la souris  $\lambda$ c-MYC n'est pas due à l'accumulation de lymphocytes B.

Enfin, l'analyse histologique des rates indique que l'injection des ODN-CpG provoque l'afflux de leucocytes de grande taille dans la pulpe rouge (Figure 6). Aucune différence histologique n'est observée entre la souris  $\lambda$ c-MYC et la souris sauvage.



**Figure 6 : Histologie de la rate après stimulation *in vivo* du TLR9.**

Injection d'ODN-ctl ou -CpG à une souris sauvage (wt) ou  $\lambda$ c-MYC (âgées de 6 semaines) pendant 15 jours à raison de 3 injections par semaine. Les rates sont incluses en paraffine et des coupes de 5  $\mu$ m sont réalisées puis colorées à l'Hématoxyline-Éosine. Rate de souris sauvage (A.) et  $\lambda$ c-MYC (B.) après injection ODN-ctl : dans la pulpe blanche présence de follicules lymphoïdes (LF) délimités par la zone marginale (ZM). La pulpe rouge (RP) est formée de sinus sanguins et de cordons cellulaires (macrophages, plasmocytes, globules rouges, et globules blancs). Rate de souris sauvage (C.) et  $\lambda$ c-MYC (D.) après injection ODN-CpG : la pulpe rouge (RP) est formée de larges cordons cellulaires (C, flèche blanche) constitués de grands et petits leucocytes (histiocytes?) visualisables au grossissement x600.

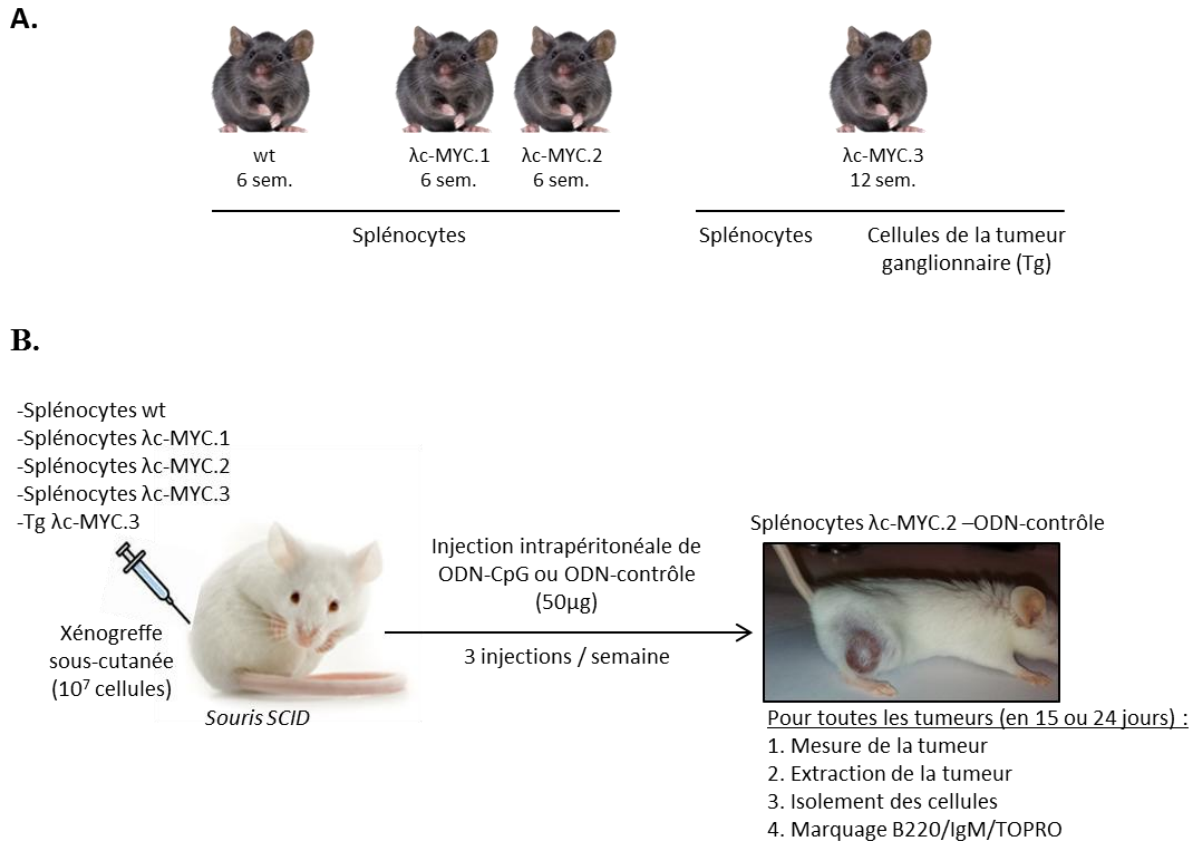
En résumé, la stimulation *in vivo* par des motifs CpG augmente l'activation et la prolifération des cellules B  $\lambda$ c-MYC par rapport aux cellules sauvages. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans l'article « NF- $\kappa$ B Activation by Epstein-Barr Virus Infection Promotes MYC-dependant Lymphomagenesis in early phases of Burkitt's Lymphomas. » (cf. Résultats Partie 1). Néanmoins, l'effet activateur du TLR9 sur les cellules  $\lambda$ c-MYC n'est pas

associé à une augmentation du processus tumoral *in vivo* puisque la taille de la rate ainsi que la quantité de lymphocytes B vivants dans celle-ci sont diminuées par rapport à une souris sauvage également stimulée. Ce résultat pourrait s'expliquer par une élimination des cellules B pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC par le système immunitaire stimulé par les ODN-CpG.

## 2. Effets de la stimulation du TLR9 sur le développement tumoral dans un contexte d'immunodépression

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'effet prolifératif des ODN-CpG sur les lymphocytes B  $\lambda$ c-MYC serait masqué *in vivo* par leur élimination par le système immunitaire, nous avons xéno greffé ces cellules à des souris immunodéprimées SCID.

Nous avons isolé les cellules de rates et de tumeurs ganglionnaires issues de souris transgéniques  $\lambda$ c-MYC (Figure 7A). D'une part, deux souris au stade pré-tumoral âgées de six semaines,  $\lambda$ c-MYC.1 et  $\lambda$ c-MYC.2. Et d'autre part, une souris au stade tumoral âgée de 12 semaines,  $\lambda$ c-MYC.3. Cette dernière présente des tumeurs ganglionnaires brachiales et cervicales. Nous avons également isolé les splénocytes d'une souris contrôle sauvage âgée de six semaines. A partir des splénocytes et des cellules tumorales de ces animaux, des expériences de xéno greffe ont été réalisées (Figure 7B). Les souris SCID sont ensuite injectées régulièrement avec des ODN-CpG ou -contrôle.



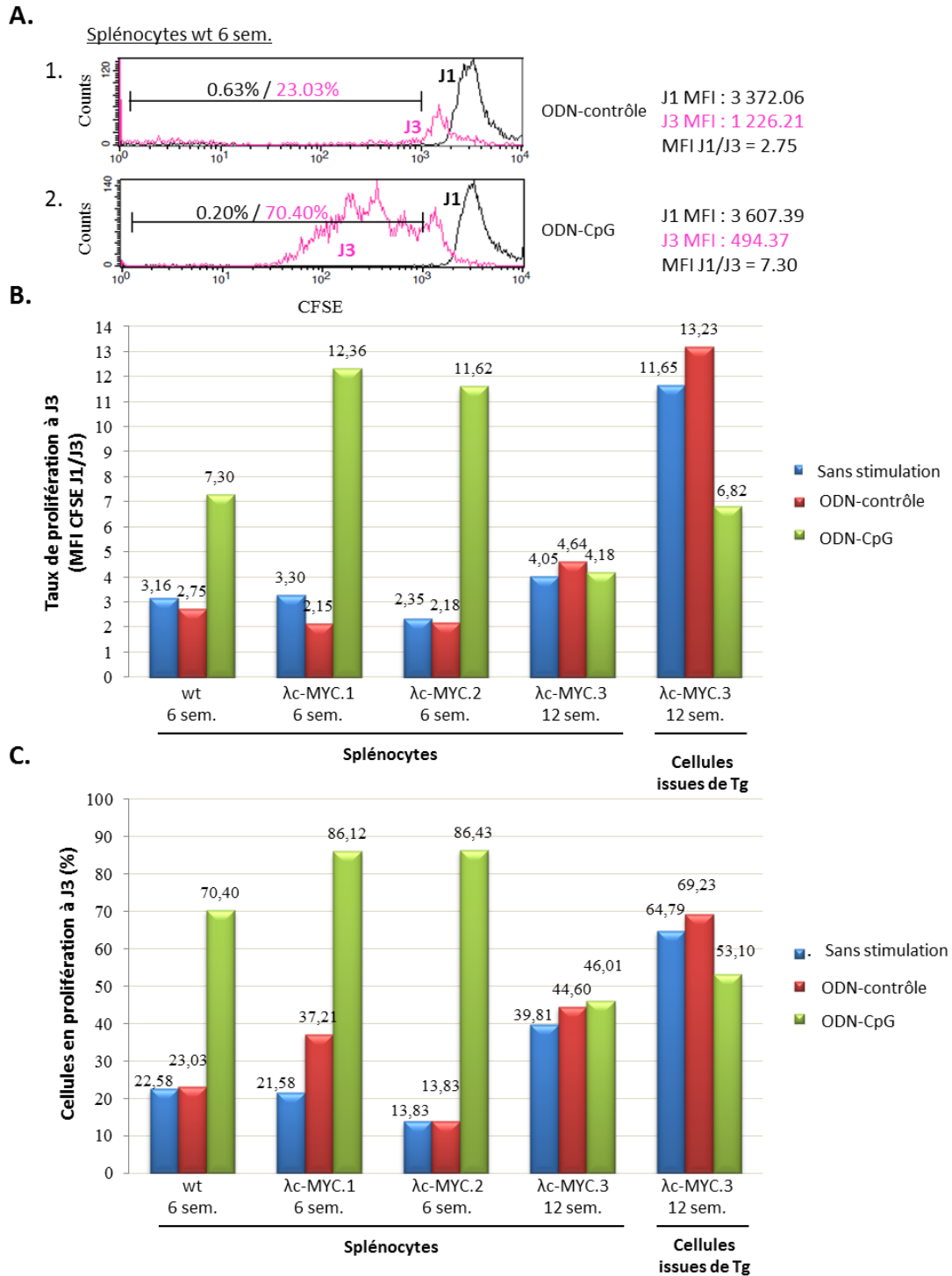
**Figure 7 : Expériences de xélogreffe sur souris SCID réalisées pour étudier l'effet de la stimulation du TLR9 in vivo.**

**A.** Souris contrôle/sauvage (wt, wild type) ou λc-MYC utilisées pour isoler les splénocytes et les cellules de la tumeur ganglionnaire (Tg). D'une part, 2 souris λc-MYC pré-tumorales de 6 semaines (λc-MYC.1 et .2) et d'autre part, une souris λc-MYC de 12 semaines (λc-MYC.3) ayant des tumeurs ganglionnaires brachiale et cervicale. Sur cette dernière, seule la tumeur ganglionnaire brachiale est récupérée (Tg λc-MYC.3). **B.** Les splénocytes et les cellules issues de la tumeur ont été greffés à des souris SCID. Puis 3 fois par semaine, les TLR9 ont été stimulés par des injections intra-péritonéales d'ODN-CpG ou d'ODN-Contrôle. Au bout de 15 ou 24 jours (suivant la taille de la tumeur), la tumeur a été mesurée et a été récupérée ainsi que la rate.

## 2.1 Effet de la stimulation du TLR9 sur la prolifération cellulaire *ex vivo*

En parallèle des xélogreffes, nous avons suivi *ex vivo* la prolifération des splénocytes et des cellules tumorales isolées par une approche de marquage au CFSE (Figure 8A). Pour les souris pré-tumorales λ-MYC.1 et λc-MYC.2, la stimulation par les motifs CpG induit un taux de prolifération plus important des splénocytes par rapport aux cellules sauvages (wt) : 12,36 et 11,62 pour les splénocytes λ-MYC.1 et λc-MYC.2 respectivement contre 7,30 pour les splénocytes sauvages (Figure 8B). Cette stimulation est spécifique puisque les ODN-contrôle n'ont pas cet effet.





**Figure 8 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur la prolifération ex vivo des cellules λc-MYC.**

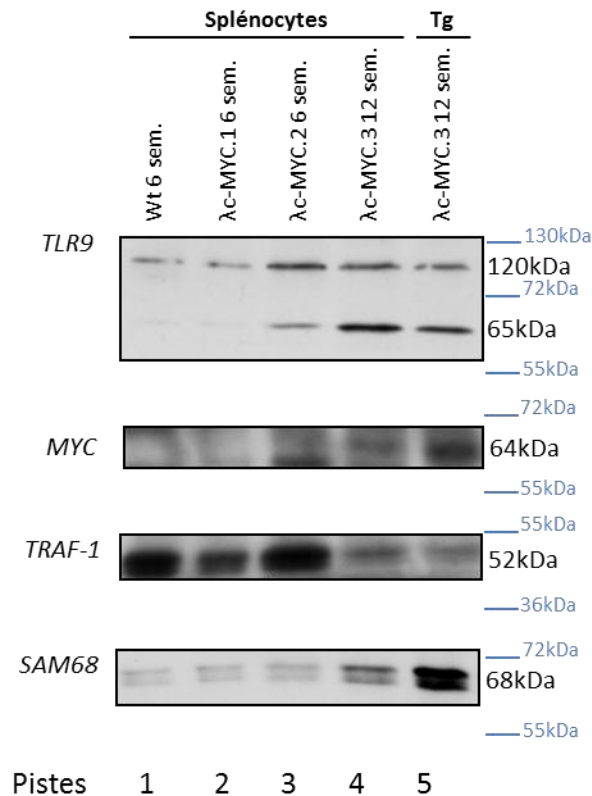
Nous avons utilisé 4 souris : une souris sauvage (wt, wild type) de 6 semaines, 2 souris λc-MYC de 6 semaines dites pré-tumorales (λc-MYC.1 et 2) et une souris λc-MYC de 12 semaines au stade tumoral i.e. avec tumeur ganglionnaire ou Tg (λc-MYC.3). Les cellules des rates (splénocytes) et de la tumeur (Tg) ont été isolées et stimulées soit par i) des ODN-contrôle (histogrammes rouges), ii) des ODN-CpG (histogrammes verts), ou iii) ne sont pas stimulées (histogrammes bleus). Puis, elles sont marquées au CFSE au jour 0. **A.** Méthodologie pour l'analyse des résultats. Au jour 1 (J1) et 3 (J3), le TO-PRO®-3 est rajouté aux cellules puis elles sont passées au cytomètre en flux pour mesurer les fluorescences émises par le TO-PRO®-3 et le CFSE. Après fenêtrage sur les cellules vivantes TO-PRO®-3 négative, on obtient le cytogramme qui montre le nombre d'évènements en fonction de la fluorescence CFSE. Ici sont représentés ceux obtenus pour les splénocytes de la souris wt stimulés par les ODN-contrôle (1. panel du haut) ou les ODN-CpG (2. panel du bas) : en noir pour le jour 1 et en rose pour le Jour 3. Le taux de prolifération est égal à la MFI J1/J3. MFI, Mean Fluorescent Intensity. **B.** Taux de prolifération des cellules après 3 jours de stimulation par les ODN-CpG ou -contrôle. **C.** Pourcentage de cellules en prolifération parmi les cellules vivantes. Il s'agit du pourcentage de cellules ayant perdues la fluorescence du CFSE au jour 3.

En revanche, les stimulations des splénocytes issus de la souris tumorale  $\lambda$ c-MYC.3 montrent que les ODN-CpG n'ont pas d'impact sur la prolifération. Plus encore, pour les cellules isolées de la tumeur, la présence des ODN-CpG diminue le taux de prolifération. Sans stimulation, notons que la prolifération des splénocytes et des cellules de la tumeur est augmentée respectivement d'un facteur 1,5 et 4 par rapport aux splénocytes pré-tumoraux ( $\lambda$ c-MYC.1 et  $\lambda$ c-MYC.2). Au stade tumoral, les cellules ont donc acquis une autonomie de prolifération.

Le pourcentage de cellules en prolifération évolue comme le taux de prolifération: pour exemple 86,12% et 86,43% pour les splénocytes  $\lambda$ c-MYC.1 et  $\lambda$ c-MYC.2 respectivement contre 70,40% pour les splénocytes sauvages (Figure 8C).

## 2.2 Expression du TLR9 et activation de NF- $\kappa$ B selon le stade du processus tumoral dépendant de MYC

Dans le but de comprendre les différences d'effets de la stimulation du TLR9 en fonction du stade du développement tumoral, nous avons comparé l'expression des protéines MYC, TLR9 et TRAF-1 (gène cible de NF- $\kappa$ B) entre des splénocytes pré-tumoraux et tumoraux et également dans les cellules issues de la tumeur (Figure 9).



**Figure 9 : Expression du TLR9, MYC et TRAF-1 selon le stade du processus tumoral dépendant de MYC.**

Nous avons utilisé 4 souris : une souris sauvage (wt, wild type) de 6 semaines, 2 souris λc-MYC de 6 semaines dites pré-tumorales (λc-MYC.1 et 2) et une souris λc-MYC de 12 semaines au stade tumoral i.e. avec tumeur ganglionnaire ou Tg (λc-MYC.3). Les cellules des rates (splénocytes) et de la tumeur (Tg) ont été isolées et des extraits protéiques sont réalisés dans du bleu de Laemmli contenant 5% de β-mercaptoéthanol. A partir de  $1 \times 10^6$  cellules, l'expression du TLR9, MYC et TRAF-1 est analysé par western-blot. SAM68 est utilisé comme contrôle de charge. Le marqueur de taille utilisé est le PageRuler (en bleu).

Comme dit en introduction, le TLR9 se présente sous une forme entière/inactivable (120 kDa) et une forme clivée/activable (65 kDa). Considérant ces deux formes, nos résultats de western-blot montrent que la quantité de forme clivée par rapport à la forme totale augmente au stade tumoral (Figure 9, comparer les pistes 1-3 avec les pistes 4-5).

La révélation de la protéine MYC montre son expression dans les splénocytes des souris λc-MYC.2 et λc-MYC.3 ainsi que dans la tumeur ganglionnaire (Figure 9, pistes 3-5). L'absence de détection de MYC dans les splénocytes de l'animal λc-MYC.1 (Figure 9, piste 2) est sans doute liée à sa faible expression dans les cellules pré-tumorales, comme décrit par AL. Kovalchuk (Kovalchuk *et al.*, 2000).

Enfin, la révélation de l'expression de la protéine TRAF-1 permet d'évaluer l'activation de la voie NF-κB associée à un signal anti-apoptotique. Les résultats de western-blot indiquent une diminution de l'expression de TRAF-1 à la fois dans les splénocytes et les cellules tumorales de la

souris  $\lambda$ c-MYC.3 comparée aux cellules issues des souris pré-tumorales (Figure 9, comparer les pistes 2-3 avec les pistes 4-5).

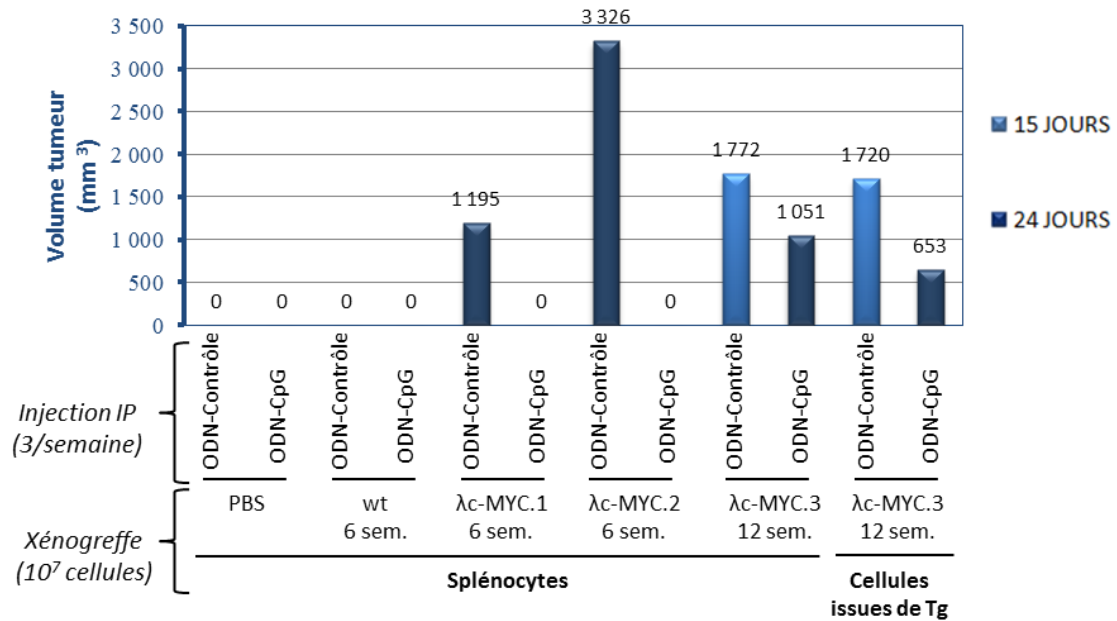
### 2.3 Etude du rôle de la stimulation du TLR9 sur le développement tumoral in vivo

Pour suivre le devenir des cellules  $\lambda$ c-MYC *in vivo* sous l'effet d'une stimulation du TLR9 sans intervention du système immunitaire, nous avons travaillé dans un contexte d'immunodépression chez la souris SCID.

Les splénocytes issus des souris  $\lambda$ c-MYC.1,  $\lambda$ c-MYC.2 et  $\lambda$ c-MYC.3 ainsi que les lymphocytes tumoraux ganglionnaires de la souris  $\lambda$ c-MYC.3 sont xéno greffés aux souris SCID, puis ces dernières sont soumises à des stimulations répétées du TLR9 grâce à l'injection d'ODN-CpG en intrapéritonéal trois fois par semaine. L'expérience est arrêtée au bout de 15 ou 24 jours en fonction du volume de la tumeur.

Comme attendu, les résultats indiquent que les souris SCID ayant reçu du PBS ou des splénocytes sauvages n'ont pas développé de tumeurs quelle que soit la condition d'injection en intrapéritonéal (ODN-Contrôle ou ODN-CpG) (Figure 10). En revanche, pour les cellules de la rate issues des souris pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC.1 et  $\lambda$ c-MYC.2, seule la condition de stimulation ODN-Contrôle a permis le développement d'une tumeur.

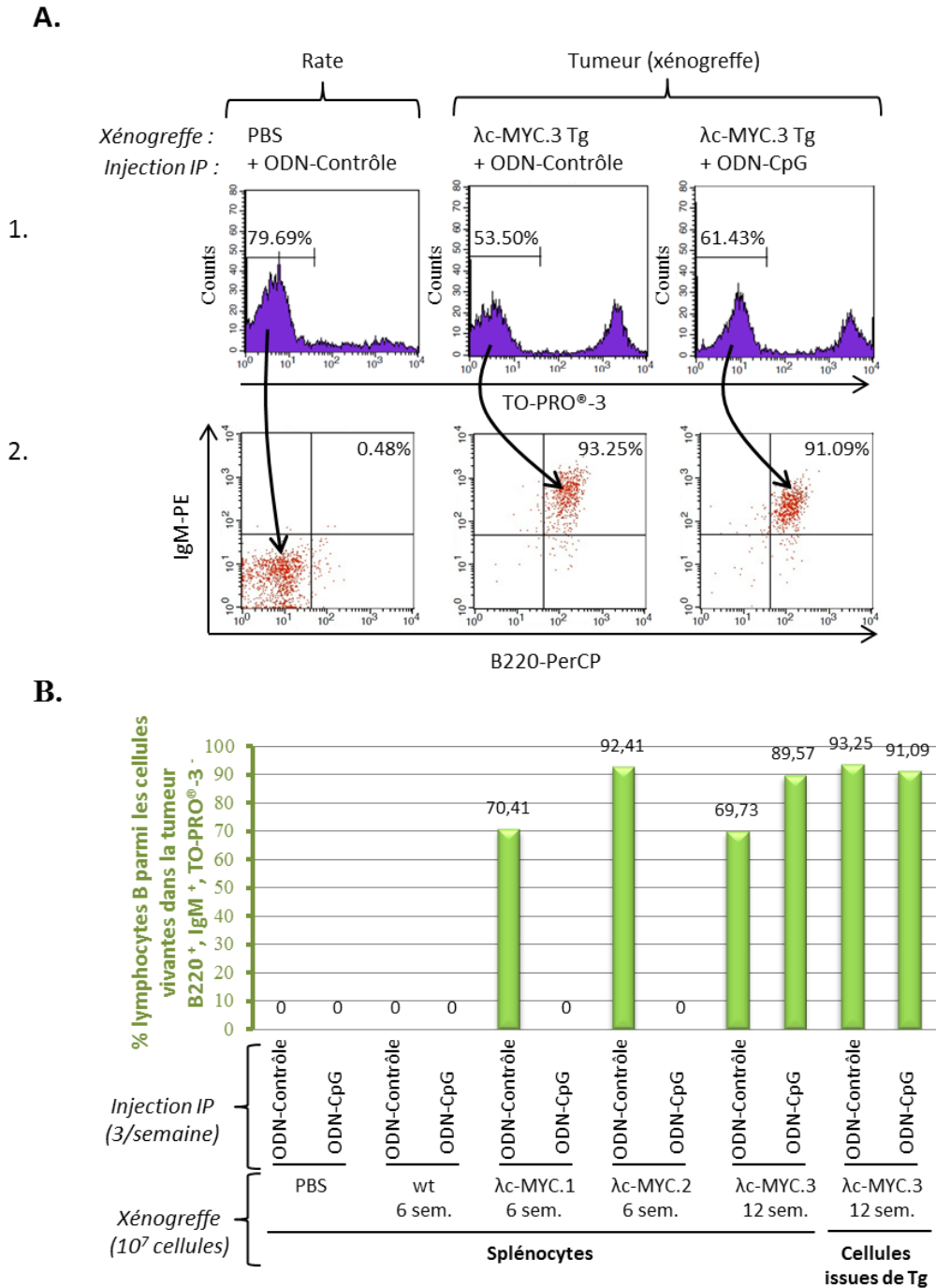
Les souris SCID ayant reçu des splénocytes ou des cellules tumorales provenant de la souris  $\lambda$ c-MYC.3 développent des tumeurs quelle que soit la condition de stimulation (ODN-Contrôle ou ODN-CpG). Cependant, la tumeur qui se développe est plus importante dans la condition ODN-Contrôle : 1 772 mm<sup>3</sup> avec ODN-contrôle contre 1 051 mm<sup>3</sup> avec ODN-CpG pour les splénocytes et 1 720 mm<sup>3</sup> avec ODN-contrôle contre 633 mm<sup>3</sup> avec ODN-CpG pour les cellules de la tumeur ganglionnaire.



**Figure 10 : Etude de la croissance tumorale in vivo par des expériences de xénogreffe sur souris SCID.**

Nous avons utilisé 4 souris : une souris sauvage (wt, wild type) de 6 semaines, 2 souris λc-MYC de 6 semaines dites pré-tumorales (λc-MYC.1 et 2) et une souris λc-MYC de 12 semaines au stade tumoral i.e. avec tumeur ganglionnaire ou Tg (λc-MYC.3). Les cellules des rates (splénocytes) et de la tumeur (Tg) ont été isolées puis xénogreffées (10<sup>7</sup> cellules) à des souris SCID. Les souris contrôles ont reçu des injections de PBS. Les souris SCID sont ensuite stimulées par des ODN-CpG ou des ODN-Contrôle en injection intra-péritonéale (IP) 3 fois par semaine. Au bout de 15 ou 24 jours, les tumeurs ont été mesurées et l'expérience arrêtée. Le volume des tumeurs est reporté sur un histogramme. Les tumeurs ont été assimilées à des cylindres pour calculer leur volume ( $V = \pi \times R^2 \times h$ ).

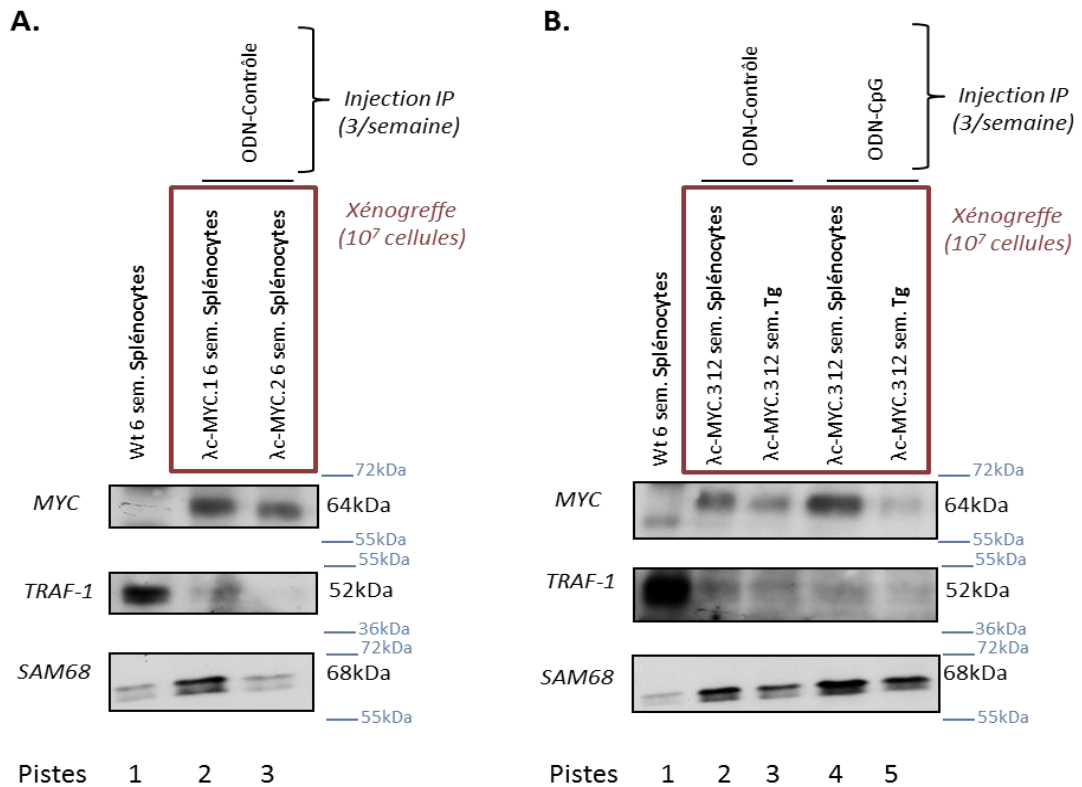
Nous avons ensuite vérifié que les tumeurs obtenues étaient bien formés par les cellules xénogreffées. Pour ce faire, nous avons déterminé le pourcentage de cellules B matures B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> parmi les cellules vivantes TO-PRO<sup>®</sup>-3 négatives (Figure 11A). Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme dans la Figure 11B. Ainsi, 70 à 90% des cellules vivantes des tumeurs sont les cellules B λc-MYC greffées.



**Figure 11 : Détermination du pourcentage de cellules B dans les tumeurs développées chez la souris SCID.**

Chez la souris SCID, nous avons obtenu une tumeur après injection i) des splénocytes issus des souris pré-tumorales  $\lambda$ MYC.1 et  $\lambda$ MYC.2 sous condition d'injection IP (intra-péritonéal) ODN-contrôle, ii) des splénocytes de la souris tumorale  $\lambda$ MYC.3 sous condition d'injection IP ODN-contrôle et ODN-CpG et iii) des cellules issues de la tumeur ganglionnaire (Tg) de la souris tumorale  $\lambda$ MYC.3 sous condition d'injection IP ODN-contrôle et ODN-CpG. Les cellules de la rate et des tumeurs ont été isolées puis un immunomarquage B220/IgM/TO-PRO<sup>®</sup>-3 est réalisé. **A.** Méthodologie pour déterminer le pourcentage de lymphocytes B B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> parmi les cellules vivantes TO-PRO<sup>®</sup>-3<sup>-</sup> en cytométrie en flux. (1. Panel du haut) Histogramme permettant de fenêtrer sur les cellules viables (TO-PRO<sup>®</sup>-3<sup>-</sup>). (2. Panel du bas) Cytogramme permettant de déterminer le pourcentage de cellules B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> parmi les cellules vivantes. Le premier marquage concerne les splénocytes de la souris SCID injectée avec du PBS et stimulée par des ODN-Contrôle, le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> concernent les cellules des tumeurs SCID développées après xénogrefe des cellules issues de la tumeur ganglionnaire (Tg) de la souris  $\lambda$ c-MYC.3 puis stimulées par des ODN-Contrôle pour l'une et des ODN-CpG pour l'autre. **B.** Histogramme regroupant le pourcentage de lymphocytes B vivants B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> pour toutes les tumeurs SCID.

Enfin, pour chacune des tumeurs développées sur les souris SCID, nous avons analysé l'expression des protéines MYC et TRAF-1 (Figure 12). L'expression de MYC est retrouvée dans l'ensemble des tumeurs, ces dernières étant toutes issues de cellules de souris  $\lambda$ -MYC. L'expression de TRAF-1 est diminuée dans toutes les tumeurs par rapport aux splénocytes sauvages.



**Figure 12 : Expression de MYC et TRAF-1 dans les tumeurs SCID.**

Chez la souris SCID, nous avons obtenu une tumeur après injection i) des splénocytes issus des souris pré-tumorales  $\lambda$ MYC.1 et  $\lambda$ MYC.2 sous condition d'injection IP (intra-péritonéal) ODN-contrôle, ii) des splénocytes de la souris tumorale  $\lambda$ MYC.3 sous condition d'injection IP ODN-contrôle et ODN-CpG et iii) des cellules issues de la tumeur ganglionnaire (Tg) de la souris tumorale  $\lambda$ MYC.3 sous condition d'injection IP ODN-contrôle et ODN-CpG. Les cellules de ces tumeurs ont été isolées puis lysées avec du bleu de Laemmli contenant 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol. A partir de  $1 \times 10^6$  cellules, l'expression du TLR9, MYC et TRAF-1 est analysé par western-blot. SAM68 est utilisé comme contrôle de charge. Le marqueur de taille utilisé est le PageRuler (en bleu). **A.** Les cellules utilisées sont celles de la rate de la souris wt à 6 semaines avant xénogreffe (piste 1); de la tumeur de la souris SCID (ODN-Contrôle) ayant reçu les splénocytes des souris pré-tumorales  $\lambda$ -MYC.1 (piste 2) et  $\lambda$ -MYC.2 (piste 3). **B.** Les cellules utilisées sont celles de la rate de la souris wt à 6 semaines avant xénogreffe (piste 1); de la tumeur de la souris SCID ayant reçu les splénocytes de la souris tumorale  $\lambda$ -MYC.3 (pistes 2 et 4) ou ayant reçu les cellules de la tumeur ganglionnaire (Tg) de la souris tumorale  $\lambda$ -MYC.3 (pistes 3 et 5). Les cellules des pistes 2 et 3 ont été stimulées par les ODN-Contrôle alors que celles des pistes 4 et 5 par les ODN-CpG.

En résumé, la xénogreffe de splénocytes pré-tumoraux à des souris SCID a révélé que la stimulation du TLR9 empêchait le développement de tumeur et ce malgré l'absence de lymphocytes B et T matures chez la souris SCID.

## V. Discussion et perspectives

La stimulation du TLR9 provoque une activation des lymphocytes B conduisant à une augmentation de leur taille et permet aussi leur prolifération conduisant à une augmentation de leur nombre (Krieg *et al.*, 2000). Ainsi, nos premières expériences de stimulation *in vivo* du TLR9 sur souris transgénique  $\lambda$ c-MYC au stade pré-tumoral montrent une splénomégalie. Les résultats de ces mêmes expériences réalisées chez des animaux sur fond génétique MYD88<sup>+/-</sup> hétérozygote montrent une augmentation moindre du poids des rates. Ce résultat indique que la splénomégalie observée est bien imputable à la signalisation du TLR9 via la protéine adaptatrice MYD88. En effet, il existe une autre voie de signalisation initiée par les ODN-CpG. Cette voie est TLR9/MYD88-indépendante et implique l'activation des kinases de la famille SRC (LYN et Hck) (Sanjuan *et al.*, 2006). Toutefois le récepteur initiant cette voie de signalisation n'est pas identifié mais celui-ci serait localisé au niveau de la membrane plasmique.

Nos résultats montrent que la stimulation du TLR9 conduit à une augmentation de l'activation des cellules B  $\lambda$ c-MYC ainsi qu'à une augmentation de la prolifération des splénocytes totaux *ex vivo et in vivo* en comparaison avec des cellules sauvages. L'activation des cellules B en réponse aux ODN-CpG sera validée grâce à un marquage du marqueur Ki-67 sur coupe histologique de rate de souris  $\lambda$ c-MYC ayant reçu des injections d'ODN-CpG.

Néanmoins, la quantité de lymphocytes B vivants dans la rate est diminuée par rapport à une souris sauvage également stimulée. L'activation du TLR9 conduit à l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I et II et du CD40 favorisant l'expression des antigènes de surface et donc la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules T CD4<sup>+</sup> (Wooldridge and Weiner, 2003 ; Jahrsdorfer *et al.*, 2005). De plus, la production d'IFN $\alpha$  et  $\beta$  par les cellules dendritiques plasmacytoïdes activées par le TLR9 pourrait également contribuer à l'effet anti-tumoral des ODN-CpG en renforçant la réponse immunitaire via l'activation des cellules NK, des monocytes et des macrophages (Krieg, 2006). La stimulation *in vivo* du TLR9 pourrait donc initier une réponse immunitaire contre les cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC et être responsable de leur élimination. Les résultats d'histologie montrent la présence de grands leucocytes au niveau de la pulpe rouge des rates des souris ayant reçu des ODN-CpG. La nature de ces leucocytes reste à déterminer mais il pourrait s'agir de cellules de l'immunité innée telles que des macrophages ou des granulocytes. Pour caractériser les cellules observées, nous réaliseront sur coupes



histologiques des immunomarquages ciblant des marqueurs spécifiques des macrophages tels que le MAC-1 (CD11b) et des granulocytes tels que le GR-1.

La dérégulation de l'expression de MYC dans les souris  $\lambda$ c-MYC est associée à une augmentation du TLR9 clivé/activable au stade tumoral. Ce résultat est cohérent avec la sur-expression du TLR9 décrite dans des lignées de lymphome de Burkitt (Henault *et al.*, 2005).

La question qui se pose alors est pourquoi la stimulation TLR9 conduit-elle à l'apoptose au stade tumoral alors que la cellule dispose d'un plus grand nombre de récepteur clivé/activable? NF- $\kappa$ B est un facteur ambivalent qui peut selon son niveau d'activation être anti- ou pro-apoptotique (Le Clorennec *et al.*, 2008). On peut ainsi poser l'hypothèse qu'au stade tumoral la stimulation TLR9 induirait une forte activation de NF- $\kappa$ B responsable alors de l'expression de facteurs pro-apoptotiques. Cette hypothèse fait référence aux travaux de l'équipe qui montrent qu'une forte expression de LMP1 et par conséquent de NF- $\kappa$ B conduit à l'apoptose CD95-dépendante (Le Clorennec *et al.*, 2006). De plus, une étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine CD95/FAS et une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-XL dans une lignée murine de lymphome B (lignée CH27) dont la stimulation par des ODN-CpG induit l'apoptose (Arunkumar *et al.*, 2013). Nous aurons à comparer l'effet des ODN-CpG entre cellules pré-tumorales et tumorales  $\lambda$ c-MYC en regardant l'expression de gènes cibles de NF- $\kappa$ B *i)* anti-apoptotiques tels que les c-IAP (*cellular inhibitor of apoptosis protein*), les membres de la famille BCL2, A20 et c-Flip (*cellular FLICE inhibitor protein*) et *ii)* pro-apoptotiques tels que le FASL, CD95/FAS, TP53 et p21WAF1/CIP1. Comprendre pourquoi au stade tumoral il y a une augmentation du clivage du TLR9 fera également partie de nos perspectives.

TRAF-1 est un gène cible de NF- $\kappa$ B qui participe à son activation *via* son interaction avec les récepteurs membranaires tel que le CD40 (Wang *et al.*, 1998). En faveur de notre hypothèse, nous observons que le niveau d'activation de NF- $\kappa$ B relative à l'expression de TRAF-1, est diminué entre le stade pré-tumoral et le stade tumoral. Ce résultat qui indique que NF- $\kappa$ B est très faible dans la tumeur Burkitt est en accord avec la littérature. En effet, la faible expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B est admise comme une marque du lymphome de Burkitt (Dave *et al.*, 2006 ; Hummel *et al.*, 2006). En revanche, au stade pré-tumoral l'expression de TRAF1 est stable par rapport à des splénocytes de souris sauvages, indiquant que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B serait permise à ce stade précoce du développement tumoral.

Comme nous l'avons vu en introduction, le lymphome de Burkitt est fréquemment associé à un contexte d'immunodépression (Perry *et al.*, 2005). Ainsi, pour étudier le rôle de la stimulation du TLR9 sur le développement tumoral *in vivo*, nous nous sommes placés dans des conditions d'immunodépression *via* la xéno greffe des cellules pré-tumorales et tumorales de souris  $\lambda$ c-MYC. Comme attendu d'après nos résultats *ex vivo*, les cellules au stade tumoral ont une croissance ralentie en présence d'ODN-CpG. De plus, les tumeurs développées n'expriment pas le facteur TRAF1 même après stimulation par les ODN-CpG. Dans ces cellules tumorales, la stimulation de NF- $\kappa$ B par le TLR9 pourrait induire des facteurs pro-apoptotiques et ralentir la croissance tumorale.

Après xéno greffe des splénocytes pré-tumoraux  $\lambda$ c-MYC, l'expression de TRAF-1 est diminuée, indiquant que la voie NF- $\kappa$ B n'est plus activée. Ce résultat suggère qu'en l'absence du microenvironnement splénique les cellules B  $\lambda$ c-MYC ne peuvent plus être stimulées pour l'activation de NF- $\kappa$ B. Contrairement aux résultats *ex vivo*, les xéno greffes des splénocytes pré-tumoraux aux souris SCID montrent que la stimulation par les ODN-CpG empêche la croissance tumorale. Bien que sans lymphocytes B ni T matures, les souris SCID possèdent les acteurs de l'immunité innée. Nous faisons l'hypothèse que la stimulation TLR9 des souris SCID joue un rôle activateur de l'immunité innée *via* les cellules dendritiques puis les cellules NK, lesquelles viendraient éliminer les cellules greffées. Afin de tester notre hypothèse, nous avons pour perspective d'utiliser des souris encore plus immunodéprimées soit les souris RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> qui n'ont ni lymphocytes B, ni lymphocytes T et ni cellules NK.

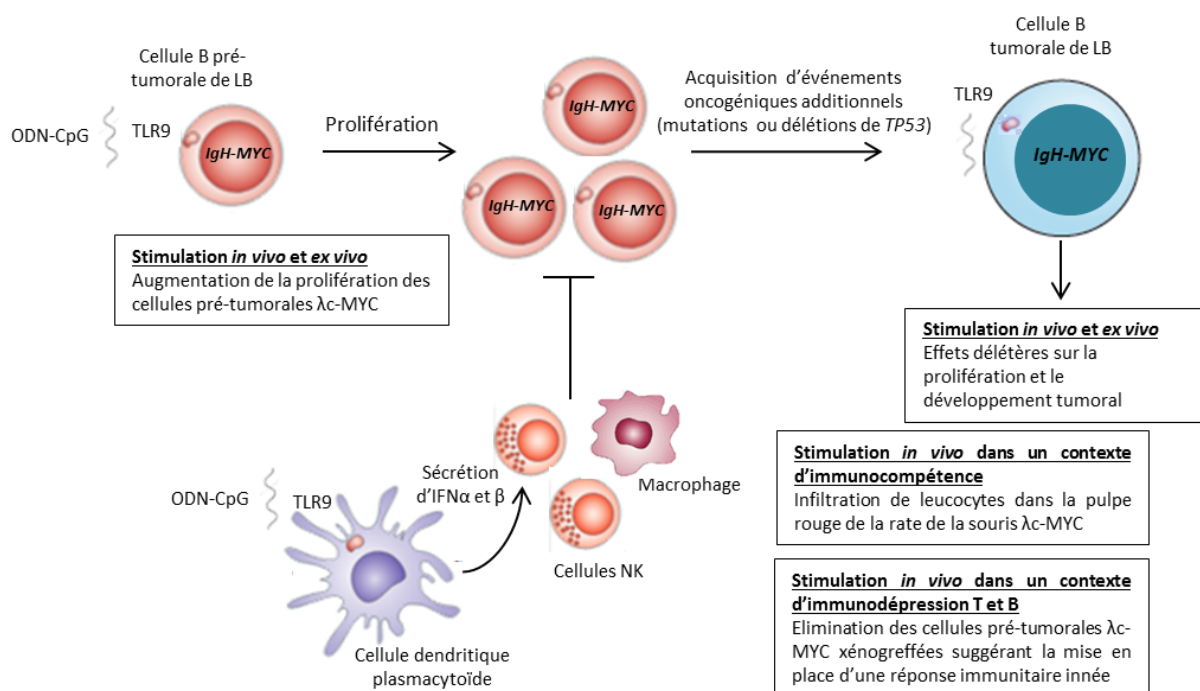
## VI. Conclusions

Nos résultats indiquent que la stimulation *in vivo* du TLR9 augmente l'activation et la prolifération des lymphocytes B  $\lambda$ c-MYC mais sans augmentation du nombre absolu de cellules B dans la rate. Ce résultat pourrait s'expliquer par une élimination des cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC de l'organisme par le système immunitaire. Les résultats d'histologie ont révélé une infiltration de leucocytes dans la pulpe rouge des rates ayant reçu des injections d'ODN-CpG ce qui pourrait appuyer notre hypothèse.

Nos expériences de xéno greffes aux souris SCID n'ont pas permis l'obtention de tumeurs à partir de splénocytes pré-tumoraux  $\lambda$ c-MYC, suggérant une implication de l'immunité innée dans l'élimination des cellules greffées.

Les données obtenues montrent également que la stimulation du TLR9 conduit à une augmentation de la prolifération lorsque les cellules B  $\lambda$ c-MYC sont au stade pré-tumoral mais plus quand la tumeur est établie. L'augmentation du clivage du TLR9 vers sa forme activable au stade tumoral sensibiliserait les cellules à l'apoptose induite par une forte activation de NF- $\kappa$ B.

Nos résultats sont en faveur du modèle selon lequel, dans un contexte d'immunodépression, la stimulation du TLR9 (par l'EBV ou *plasmodium falciparum*) pourrait favoriser le développement du lymphome de Burkitt. Ce modèle est illustré dans la Figure 13, ci-dessous.



**Figure 13 : Rôle de la stimulation du TLR9 dans la pathogenèse associée au lymphome de Burkitt.**

La stimulation ex vivo et in vivo du TLR9 sur des cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC conduit à une augmentation de leur prolifération. Cet effet n'est pas retrouvé au stade tumoral. La stimulation du TLR9 in vivo, semble conduire à une élimination des cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC par le système immunitaire dans un contexte d'immunodépression T et B suggérant une implication de la réponse immunitaire innée dans ce phénomène grâce à l'activation des cellules dendritiques qui vont sécréter des INF de type I responsables de l'activation des cellules NK et des macrophages. Les encadrés correspondent aux résultats expérimentaux obtenus permettant d'appuyer ce modèle.

## **Partie 4**

### **Résultats préliminaires**

**Modèle murin d'ABC-DLBCL : un  
modèle de coopération entre  
l'activation constitutive de  
NF- $\kappa$ B et c-Myc ?**



## Partie 4 : Résultats préliminaires

### Modèle murin des lymphomes B diffus à grandes cellules de type « activé » ou ABC-DLBCL : un modèle de coopération entre l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B et MYC ?

#### I. Introduction

Considérant les anomalies génétiques ou les altérations des voies de signalisation associées, il apparaît que la genèse de la grande majorité des lymphomes B associe, à des degrés variables, des altérations de trois processus fondamentaux de la physiologie du lymphocyte B que sont : (i) les réarrangements chromosomiques et les mutations somatiques des gènes des immunoglobulines, (ii) un signal tyrosine kinase *via* le récepteur B (BCR pour *B cell Receptor*), en rapport avec l'activation antigénique et (iii) l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, résultant de l'interaction de la cellule B avec son microenvironnement, *via* notamment le récepteur CD40, les cytokines (BAFF, TNF $\alpha$ , IL-1, entre autres) et les TLR (*Toll-like Receptor*) (Chaturvedi *et al.*, 1994).

La très grande majorité des lymphomes B agressifs (30% à 40% de tous les lymphomes) sont des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL pour *Diffuse Large B-cell Lymphoma*). Malgré les progrès importants de la prise en charge thérapeutique avec une meilleure utilisation des drogues chimiotoxiques classiques et l'introduction de l'immunothérapie passive anti-CD20, 15% des DLBCL sont réfractaires aux thérapeutiques actuelles. Tous sous-types histologiques confondus, la survie globale à 4 ans est de 69% (Salles *et al.*, 2011), mais varie de 50% à 90% selon les groupes de patients (Flowers *et al.*, 2010).

En 2000, l'analyse transcriptomique des DLBCL montre l'existence de deux sous-types qui sont probablement le reflet de processus transformant divergents : le sous-type GC-DLBCL (*Germinal Center-DLBCL*) dont le phénotype est proche d'une cellule B du centre germinatif et le sous-type ABC-DLBCL (*Activated B cell-DLBCL*) de phénotype B activé (Alizadeh *et al.*, 2000). Par rapport aux GC-DLBCL, les ABC-DLBCL sont associés à une activation constitutive du facteur NF- $\kappa$ B et sont de mauvais pronostic (Rosenwald *et al.*, 2002).

Dans les ABC-DLBCL, l'activation NF- $\kappa$ B peut, entre autres, être mise en relation avec *i)* une activation permanente du récepteur CD40 (Pham *et al.*, 2005), *ii)* des mutations sur la voie d'activation NF- $\kappa$ B ou de ses inhibiteurs (Compagno *et al.*, 2009), et/ou *iii)* des mutations sur la voie du BCR et des TLR (Davis *et al.*, 2010 ; Ngo *et al.*, 2011). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule une batterie de gènes qui sont essentiels pour l'immunité innée et adaptative, la prolifération cellulaire et la survie, l'inflammation, le développement des tumeurs, la chimiorésistance et la radiorésistance (Staudt, 2010).

Jusqu'à 70% de l'ensemble des tumeurs malignes humaines montrent une expression élevée de l'oncogène MYC (Klapproth and Wirth, 2010). MYC est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et la croissance cellulaire. Tous types confondus, il est reconnu que les DLBCL présentent une dérégulation de l'oncogène MYC, les plus fortes sur-expressions correspondant aux cas les plus agressifs et les plus résistants aux thérapeutiques standards (Smith *et al.*, 2010 ; Valera *et al.*, 2013).

## II. Objectif du projet

L'accumulation simultanée ou séquentielle d'anomalies géniques est un élément clé du développement de tumeurs malignes humaines (Lindsley and LaCasce, 2012). Étant donnée l'hétérogénéité clinique et biologique (*i.e.* anomalies géniques) associée aux DLBCL, ces lymphomes sont la conséquence de plusieurs « *hits* » oncogéniques (Valera *et al.*, 2013).

La convergence des anomalies géniques vers l'activation de NF- $\kappa$ B dans les ABC-DLBCL suggère fortement que la dérégulation de cette voie est l'événement oncogénique majeur mais probablement pas suffisant. En effet, *in vivo* une activation constitutive de NF- $\kappa$ B *via* le récepteur CD40 conduit au développement d'un lymphome à évolution lente (Hömig-Hölzel *et al.*). Un tel résultat suggère l'intervention d'autres événements oncogéniques lors du processus tumoral. La dérégulation de CD40 est donc très clairement un élément lymphomatogène mais n'est probablement pas à lui seul responsable du développement d'un lymphome B agressif de type ABC-DLBCL chez l'Homme. Nous faisons l'hypothèse que l'activation endogène de NF- $\kappa$ B associée à la dérégulation MYC est principalement responsable du phénotype et de l'agressivité des ABC-DLBCL. NF- $\kappa$ B et MYC sont tous deux des oncogènes ambivalents capables à la fois de promouvoir la prolifération et d'induire l'apoptose. De plus, il apparaît que la lymphomagenèse

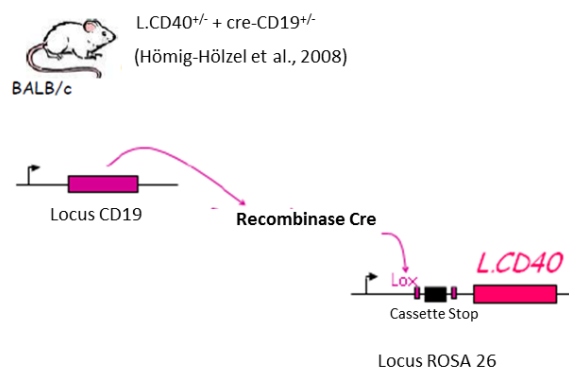
NF- $\kappa$ B et MYC sont tous deux des oncogènes ambivalents capables à la fois de promouvoir la prolifération et d'induire l'apoptose. De plus, il apparaît que la lymphomagenèse dépendante de MYC dans le lymphome de Burkitt tend à inhiber NF- $\kappa$ B au plan fonctionnel et l'activation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules tumorales est toxique (Klapproth *et al.*, 2009). Ces données de la littérature, nous amènent à poser la question d'une coopération effective entre MYC et NF- $\kappa$ B pour la transformation maligne associée aux ABC-DLBCL.

Notre objectif global est mieux comprendre le mécanisme de transformation associé aux ABC-DLBCL pour déterminer la combinatoire des cibles thérapeutiques la plus pertinente dans ces DLBCL de plus mauvais pronostic. Pour ce faire, nous avons développé un modèle murin tel que MYC et NF- $\kappa$ B soient activés constitutivement et simultanément.

### III. Matériels et méthodes

#### 1. Modèles murins

Pour mimer *in vivo* une activation constitutive de NF- $\kappa$ B, nous utilisons des souris « knock-in » dans le locus *ROSA 26* exprimant de façon conditionnelle une protéine chimérique constituée des domaines transmembranaires de LMP1 et de la partie intracellulaire du récepteur CD40 rendant constitutive l'activation de NF- $\kappa$ B, *i.e.* souris L.CD40<sup>+/-</sup> (Figure 1) (Hömig-Hölzel *et al.*, 2008).



**Figure 1 : Modèle murin conditionnel L.CD40<sup>+/-</sup> + cre-CD19<sup>+/-</sup>.**

Ce modèle est obtenu par croisement des souris L.CD40<sup>+/-</sup> (le transgène est inséré dans le locus ROSA 26 sur un seul allèle, il est précédé d'une cassette « stop » encadrée par deux sites Lox) avec les souris cre-CD19<sup>+/-</sup> exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur du gène CD19 (le cDNA de la recombinaise Cre est inséré à la place du gène CD19 sur un seul allèle). La protéine chimérique L.CD40 est exprimée uniquement dans les lymphocytes B. (Hömig-Hölzel *et al.*, 2008)



L'expression B spécifique de ce transgène est garantie grâce à l'expression de la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur CD19 (souris cre-CD19<sup>+/-</sup>) (Rickert *et al.*, 1997). Environ 60% des souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + cre-CD19<sup>+/-</sup> notée plus simplement L.CD40<sup>+/-</sup> » développent des lymphomes B avec un profil mono- ou oligoclonal entre 12 et 19 mois.

Dans le but d'apprécier *in vivo* une coopération entre NF-κB et MYC dans les processus de transformation cellulaire, les souris L.CD40<sup>+/-</sup> sont croisées aux souris transgéniques λc-MYC précédemment décrites dans l'article « NF-κB Activation by Epstein-Barr Virus Infection Promotes MYC-dependant Lymphomagenesis in early phases of Burkitt's Lymphomas. » (cf. Résultats Partie 1).

Les souris doubles transgéniques obtenues notées « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC », sont suivies dans le temps pour le développement de lymphomes B. Ces souris doubles transgéniques sont comparées aux souris négatives (wild-type, wt) ou simples transgéniques (λc-MYC et L.CD40<sup>+/-</sup>) issues des mêmes croisements.

## 2. Analyse histologique et l'isolement des cellules pour leur immunophénotypage et l'étude de la prolifération et de la survie

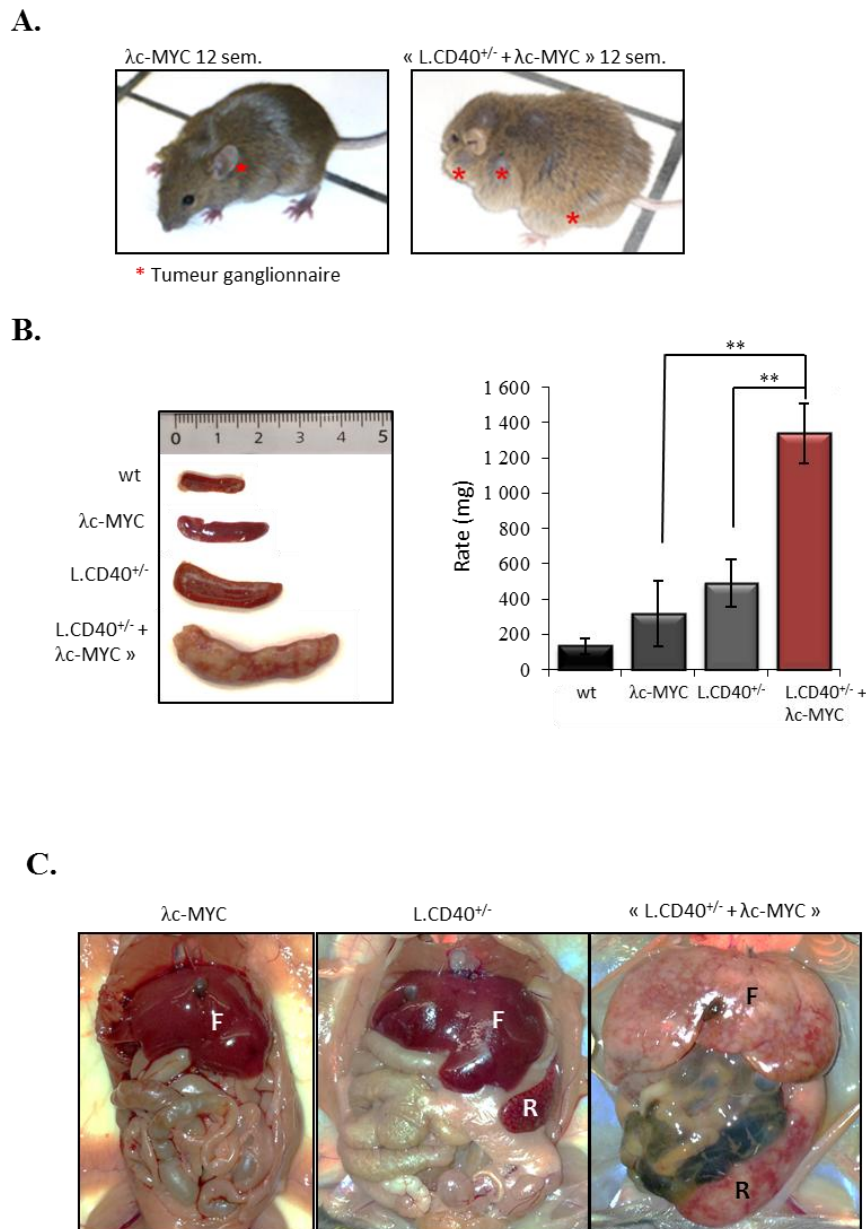
Les méthodologies utilisées sont décrites dans le chapitre Résultats Partie 3 « Résultats préliminaires : Etude du rôle du TLR9 dans la lymphomagenèse dépendante de MYC du lymphome de Burkitt ».

## IV. Résultats

### 1. Les souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC » développent des lymphomes agressifs localisés dans la rate, les ganglions lymphatiques et le foie

Le suivi du développement tumoral chez les animaux doubles transgéniques « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC » a révélé une tumorigenèse plus agressive que celle observée chez les souris simples transgéniques L.CD40<sup>+/-</sup> et λc-MYC. Ces animaux développent, entre 7 et 13 semaines, des lymphomes B agressifs qui affectent l'ensemble des sites ganglionnaires (cervical, brachial, axillaire, inguinal et méésentérique) (Figure 2A). La splénomégalie observée chez les souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC » est très importante puisque le poids de la rate est environ 10 fois plus

élevé que celui de la rate provenant de la souris sauvage (Figure 2B ;  $1\ 340 \pm 172$  mg versus  $133 \pm 46$  mg). La taille ainsi que le poids des rates des animaux simples transgéniques sont inférieurs à ceux de la rate de la souris double transgénique (Figure 2B ;  $316 \pm 186$  mg pour  $\lambda c$ -MYC et  $488 \pm 134$  mg pour L.CD40<sup>+/-</sup>). Chez ses animaux « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda c$ -MYC », le foie peut également être infiltré par les cellules tumorales (Figure 2C). L'infiltration de la rate et du foie par les cellules tumorales « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda c$ -MYC » est visible à l'observation par la présence de larges zones blanches.



**Figure 2 :** Les souris « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda c$ -MYC » développent rapidement des lymphomes agressifs au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate et du foie.

**A.** Photos des souris  $\lambda c$ -MYC et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda c$ -MYC » à 12 semaines représentant une hyperplasie massive des ganglions lymphatiques. Les étoiles rouges indiquent les sites de développement des tumeurs. **B.** Photos (panel de gauche) et poids (panel de droite) des rates des souris sauvages (wt),  $\lambda c$ -MYC, L.CD40<sup>+/-</sup> et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda c$ -MYC ». L'histogramme représente la moyenne du poids des rates sur 8-10 souris wt ou simples transgéniques et 4 souris doubles transgéniques. **C.** Photos de

*l'abdomen des souris  $\lambda$ c-MYC, L.CD40<sup>+/-</sup>, et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC ». La splénomégalie (R, rate) des animaux L.CD40<sup>+/-</sup> et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » est visible ainsi que l'atteinte du foie (F) de la souris double transgénique.*

Ces premiers résultats indiquent une coopération entre les deux voies oncogéniques CD40 et MYC puisque la tumorigenèse observée est plus agressive chez les souris doubles transgéniques « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » par rapport aux souris simples transgéniques.

## 2. Analyse histologique des tumeurs « L.CD40<sup>+/-</sup> + $\lambda$ c-MYC »

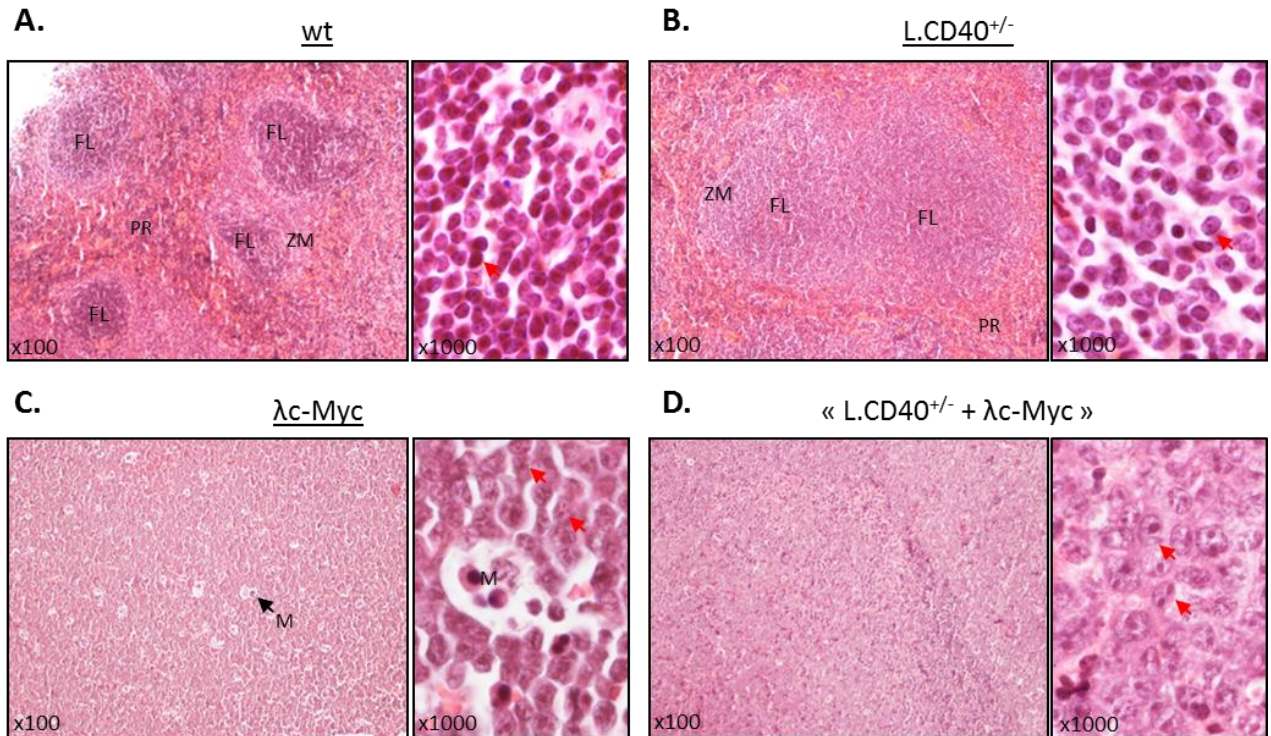
Nous avons réalisé une analyse histologique des tissus lymphoïdes à partir des différentes souris : sauvage (wild-type, wt), L.CD40<sup>+/-</sup>,  $\lambda$ c-MYC, et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC »

Comme attendu, la pulpe blanche de la rate d'une souris sauvage est constituée de petits lymphocytes au repos (Figure 3A). Comme décrit par Hömig-Hölzel *et al.*, la rate de la souris L.CD40<sup>+/-</sup> contient une pulpe blanche constituée de gros follicules lymphoïdes avec une zone marginale épaissie. Les follicules sont enrichis en grands lymphocytes avec un cytoplasme abondant que l'on peut qualifier de lymphocytes à l'aspect « activé » (Figure 3B).

Le ganglion lymphatique tumoral issu de la souris  $\lambda$ c-MYC présente une architecture ganglionnaire diffuse avec une disparition complète de la pulpe rouge. La présence de macrophages donne un aspect de « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt. Ces macrophages phagocytent les débris cellulaires issus des cellules tumorales apoptotiques. Les cellules tumorales sont de grande taille avec un noyau abondant contenant plusieurs petits nucléoles centraux (Figure 3C).

Les ganglions tumoraux des souris « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » présentent un envahissement tumoral diffus avec effacement complet de l'architecture du ganglion constitué à 90% de grandes cellules tumorales (Figure 3D). L'analyse histologique du foie lorsqu'il est envahi par les cellules tumorales montre que ces dernières ont le même aspect : noyau à la chromatine très lâche contenant un ou deux gros nucléoles (résultat non-montré).

En conclusion de cette analyse histologique, on peut dire que le co-signal CD40 et MYC changent considérablement l'architecture du tissu lymphoïde et l'orientent vers une tumeur agressive à grandes cellules B proche des DLBCL chez l'Homme.



**Figure 3 : Histologie des tissus lymphoïdes de souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC » âgées de 12 semaines.**  
Après inclusion en paraffine et réalisation des coupes de 5µm, le tissu est coloré à l'Hématoxyline-Eosine. **A.** Rate de souris sauvage (wt). Panel de gauche, image x100 : présence de petits follicules lymphoïdes (FL) délimités par la pulpe rouge (PR). La zone marginale (ZM) entourant la pulpe blanche est visible. Panel de droite, image x1000 : les FL sont constitués de petits lymphocytes au repos avec un noyau à la chromatine dense (flèche rouge). **B.** Rate de souris L.CD40<sup>+/-</sup>. Panel de gauche, image x100 : présence de gros FL avec une ZM épaissie. Panel de droite, image x1000 : les FL sont enrichis en lymphocytes de type « activé » avec un cytoplasme plus abondant et un noyau à la chromatine moins dense (flèche rouge). **C.** Ganglion lymphatique brachial tumoral de souris λc-MYC. Panel de gauche, image x100 : destruction de l'architecture ganglionnaire caractérisée par la disparition de FL et de PR. La présence de macrophages (M) donne un aspect en « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt. Panel de droite, image x1000 : les cellules tumorales qui constituent le ganglion sont de grande taille avec un noyau abondant contenant plusieurs petit nucléoles centraux (flèche rouge). **D.** Ganglion lymphatique inguinal tumoral de souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC ». Panel de gauche, image x100 : destruction totale de l'architecture ganglionnaire. Panel de droite, image x1000 : le ganglion est constitué à 90% de gros lymphocytes contenant un noyau à la chromatine très lâche avec un ou deux gros nucléoles.

### 3. La prolifération ex vivo des splénocytes des souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + λc-MYC » est augmentée

A partir des cellules tumorales de la rate, des études *ex vivo* de prolifération/survie sont menées pour déterminer comment un signal CD40 associé à MYC influence l'activation des cellules.

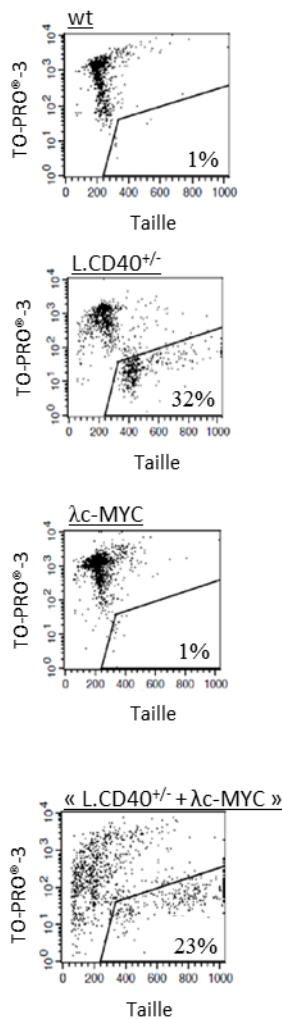
Dans un premier temps, nous avons étudié la survie cellulaire globale dans la rate grâce à un marquage TO-PRO®-3 (Figure 4A). Nos résultats indiquent que les splénocytes issus des souris sauvage et λc-MYC ne peuvent pas survivre *ex vivo* en l'absence de stimulation (1% de cellules

vivantes au bout de quatre jours). Au contraire, les splénocytes provenant des animaux L.CD40<sup>+/-</sup> et « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » survivent quatre jours après leur mise en culture avec respectivement 32% et 23% de cellules vivantes (Figure 4A).

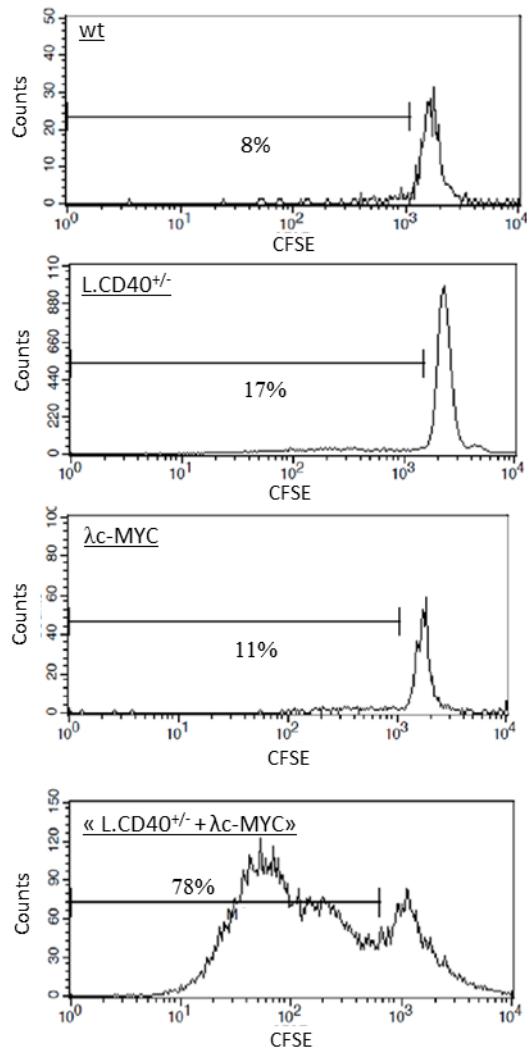
Concernant la prolifération cellulaire, 78% des splénocytes « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » prolifèrent quatre jours après marquage au CFSE contre seulement 17% et 11% pour les splénocytes L.CD40<sup>+/-</sup> et  $\lambda$ c-MYC respectivement (Figure 4B). La prolifération des splénocytes des souris « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » est donc augmentée par rapport à celle des splénocytes issus des animaux simples transgéniques, démontrant une coopération entre MYC et le signal CD40.

La caractérisation immunophénotypique des cellules tumorales des souris « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » indique un phénotype de cellules B activées : IgM intracellulaire, CD80, CD86, CD5, CD95 et CD43 (Figure 4C).

A.



B.



C.

Phénotype des cellules tumorales « L.CD40<sup>+/−</sup> + Igλc-myc » :

B220<sup>−</sup> ; CD19<sup>−</sup> ; mIgM<sup>−</sup> ; IgG1<sup>−</sup> ; Igb<sup>−</sup> ; CD138<sup>−</sup>  
 CD80<sup>+</sup> ; CD86<sup>+</sup> ; CD5<sup>+</sup> ; CD95<sup>+</sup> ; intralgM<sup>+</sup> ; CD43<sup>+</sup>

**Figure 4** : La prolifération *in vitro* des splénocytes des souris « L.CD40<sup>+/−</sup> + λc-MYC » est augmentée.

Les analyses sont réalisées sur des souris sauvage (wt, wild type), L.CD40<sup>+/−</sup>, λc-MYC et « L.CD40<sup>+/−</sup> + λc-MYC ». **A.** La viabilité des splénocytes est analysée grâce à un marquage TO-PRO<sup>®</sup>-3. Le pourcentage de cellules vivantes est évalué après fenêtrAGE sur les cellules TO-PRO<sup>®</sup>-3 négatives. **B.** Les splénocytes sont marqués au CFSE au jour 0 et mis en culture. La perte de la fluorescence (cellules en prolifération) est suivie par cytométrie en flux après quatre jours en l'absence de stimulation. **C.** Le phénotype des cellules tumorales « L.CD40<sup>+/−</sup> + λc-MYC » est déterminé à l'aide d'immunomarquages par cytométrie en flux.

## V. Discussion et perspectives

La dérégulation de la signalisation initiée par le récepteur CD40 a été observée dans plusieurs types de tumeurs humaines telles que des leucémies, lymphomes, et carcinomes (Stamenkovic *et al.*, 1989 ; Kato *et al.*, 1998 ; Eliopoulos and Young, 2004). Son implication dans le développement tumoral est controversé puisque des travaux ont suggéré un effet anti-tumoral de l'activation du récepteur CD40 incluant l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales de lymphome de Burkitt, et de myélome multiple ainsi que la sensibilisation à des agents anti-cancéreux (Vonderheide *et al.*, 2001 ; Eliopoulos and Young, 2004). Cependant, le modèle murin L.CD40<sup>+/-</sup> utilisé ici démontre qu'*in vivo*, la dérégulation de la signalisation CD40 est suffisante pour induire la transformation lymphocytaire B sur du long terme (Hömig-Hölzel *et al.*, 2008). La durée ainsi que le niveau d'activation du CD40 seraient des paramètres déterminants concernant les effets de l'activation de cette voie (Challa *et al.*, 2002).

Le modèle double transgénique « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » indique que le cosignal CD40 associé à une surexpression du facteur MYC conduit à une tumorigenèse plus agressive. L'architecture du tissu lymphoïde est de type diffus à grandes cellules B activées telles qu'observées dans les tumeurs de type ABC-DLBCL chez l'Homme.

La caractérisation des marqueurs associés aux cellules tumorales « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » a révélé un phénotype de cellules B activées : IgM<sup>+</sup> intracellulaire, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> et CD43<sup>+</sup>. En revanche, nous observons une perte d'expression de certains marqueurs B tels que B220/CD45R<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, IgM membranaire<sup>-</sup>, IgG1<sup>-</sup>, et CD79B/Ig $\beta$ <sup>-</sup>. Ce phénotype rappelle celui des DLBCL plasmablastiques pour lesquels les cellules tumorales sont plus ou moins engagées dans la différenciation plasmocytaire (Montes-Moreno *et al.*, 2010). Ces cellules tumorales sont typiquement CD20<sup>-</sup> et CD79A<sup>-</sup> et peuvent perdre le CD45R et également expriment des antigènes associés aux plasmocytes tels qu'IRF4/MUM1, BLIMP1, XBP1 et CD138. Parmi les DLBCL conventionnels (sous-type non-GCB selon la classification de Hans), 25% des cas sont également BLIMP1 positifs et cette expression est corrélée à un mauvais pronostic (Montes-Moreno *et al.*, 2010). Bien que le marqueur CD138 ne soit pas exprimé sur les cellules tumorales « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC », nous allons vérifier au niveau ARN et protéique l'expression d'IRF4/MUM1, de BLIMP1 et XBP1 régulateurs essentiels de la différenciation plasmocytaire (Klein *et al.*, 2006 ; Turner *et al.*, 1994 ; Shaffer *et al.*, 2004). Nous quantifierons également l'expression de PAX5 dans les cellules tumorales « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC ». La présence d'immunoglobulines intracytoplasmiques

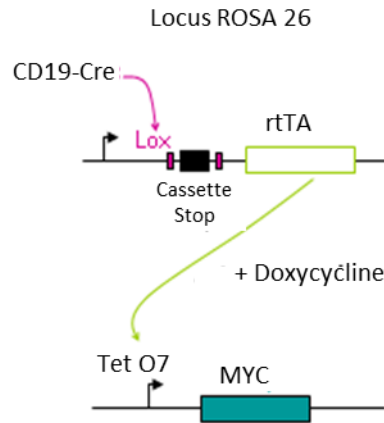
démontrée par une approche de cytométrie en flux sera validée en western-blot et suggère que les cellules « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » puissent être engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Au travers d'une analyse génomique concernant les réarrangements des gènes des immunoglobulines, nous déterminerons le stade de différenciation et la clonalité des cellules tumorales.

A partir d'échantillons de tumeurs concernant les animaux « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » obtenus, nous allons réaliser une analyse du transcriptome grâce à la puce Affymetrix® MG-430. Cette analyse nous permettra de définir les gènes les plus différentiels entre ces tumeurs et les tumeurs  $\lambda$ c-MYC seul ou L.CD40<sup>+/-</sup> seul. Nous porterons une attention particulière aux gènes cibles de NF- $\kappa$ B. Sont-ils surexprimés (comme attendu) ou inhibés par MYC (comme dans le lymphome de Burkitt) ? L'activité NF- $\kappa$ B sera également évaluée par la technique EMSA à partir d'extraits nucléaires issus de coupes de tumeurs congelées. Nous avons également établi une lignée à partir de ces cellules tumorales « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC ». Cette lignée va nous permettre d'étudier l'effet de l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B aussi bien *in vitro* en culture qu'*in vivo* après leur xéno greffe aux souris SCID.

Probablement à mettre en relation avec l'agressivité de ce double génotype, la fréquence d'obtention de ce modèle murin double transgénique est très faible soit 4 souris « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » sur 120 issues des mêmes croisements.

Pour pallier à ce problème, nous avons développé un modèle « L.CD40<sup>+/-</sup> + Tet.MYC ». Dans ce dernier, l'expression de MYC est inducible par la Doxycycline uniquement dans les lymphocytes B. Ce modèle nous permet de mimer un processus multi-étapes de lymphomagenèse. Le premier événement transformant est l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B (*via* L.CD40) et l'événement secondaire est la dérégulation de MYC (inducible par la Doxycycline). Pour ce faire, les souris L.CD40<sup>+/-</sup> (conditionnel B *via* la cre-CD19) sont croisées avec les souris « Tet.MYC + rtTa » (Figure 5).





**Figure 5 : Modèle murin conditionnel B « Tet.c-MYC + rtTa ».**

Ce modèle (Marinkovic et al., 2004) est obtenu par croisement i) des souris Tet.c-MYC (les gènes de la Luciférase et de c-MYC sont sous le contrôle d'un promoteur Bidirectionnel contenant 7 sites activateurs de la transcription TetO permettant la fixation du transactivateur rtTA ou tetracycline-dépendant transactivator en présence de Doxycycline), avec ii) des souris rtTA (le transgène est inséré dans le locus ROSA 26 avec une cassette « stop » encadrée par deux sites Lox) puis iii) des souris cre-CD19 exprimant la recombinaise cre sous contrôle du promoteur du gène CD19.

Ce modèle murin « L.CD40<sup>+/-</sup> + Tet.MYC » est aujourd'hui obtenu, nous allons maintenant tester son fonctionnement par addition de Doxycycline dans l'eau de boisson. En présence de Doxycycline, le transactivateur rtTA (*tetracycline-dependent transactivator*) se fixe aux sites TetO7 du promoteur bidirectionnel et donc va permettre l'expression à la fois du gène MYC et de la luciférase. Sur des échantillons issus de rate, nous testerons l'expression de MYC par western-blot et également l'expression de la luciférase par lecture de son activité au luminomètre.

Après plusieurs semaines d'activation constitutive de NF-κB dans les lymphocytes B (expression uniquement de L.CD40), l'addition de Doxycycline permettra de déterminer l'impact de l'expression de MYC tant sur le développement B que sur la formation de tumeurs. Des analyses histologiques et cellulaires seront réalisées pour caractériser le phénotype des cellules, et étudier leur prolifération et survie.

Nous aurons également à déterminer le rôle de NF-κB dans le processus transformant. Pour ce faire nous utiliserons *ex vivo* des inhibiteurs spécifiques de la voie classique (IκBα) ou alternative (tels que p100) afin de discriminer l'effet de chacune des deux voies NF-κB dans le développement de ces lymphomes B. Nous pourrons aussi utiliser une approche d'inhibition *in vivo* de la voie NF-κB en injectant des inhibiteurs aux souris « L.CD40<sup>+/-</sup> + Tet.MYC » avant et après le développement de tumeurs pour déterminer le rôle de la voie NF-κB respectivement dans l'initiation du processus tumoral et dans la régression tumorale. NEMO (IKKγ) jouant un

rôle important dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, nous pourrions injecter des peptides inhibiteurs de NEMO (Agou *et al.*, 2004).

Nous pourrions également nous intéresser à l'état d'activation des autres voies de signalisation induite par le récepteur CD40. En effet, la voie RAS-RAF-ERK est impliquée dans la transformation de différents types cellulaires mais aussi dans la survie et la prolifération de cellules hématopoïétiques tumorales (McCubrey *et al.*, 2007).

## VI. Conclusion

Nos résultats obtenus sur le modèle murin « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » mettent en évidence une lymphomagenèse plus agressive que celle observée chez les animaux simples transgéniques avec une atteinte de l'ensemble des sites ganglionnaires, de la rate et du foie.

L'analyse histologique des tumeurs « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » révèle un aspect diffus avec la présence de grandes cellules tumorales proche des DLBCL de type ABC chez l'Homme.

Enfin, la prolifération *ex vivo* des splénocytes « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » est plus importante que celle des splénocytes des souris simples transgéniques.

Ainsi grâce à ce modèle murin « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC », nous faisons la preuve de l'importance des signaux CD40 et MYC dans le développement d'un lymphome B diffus à grandes cellules. L'activation NF- $\kappa$ B, ainsi que l'importance de ce signal dans l'établissement de la tumeur reste à définir.



# **Chapitre IV**

## **Discussion Générale et Conclusion**



## I. Discussion générale et perspectives

Lors de ce travail, nous souhaitons savoir si NF- $\kappa$ B pouvait coopérer avec le facteur de transcription MYC dans la transformation lymphocytaire B et plus particulièrement dans deux modèles distincts de lymphomes B agressifs : le lymphome de Burkitt et les DLBCL de type « activé » ou ABC. Pour ce faire, nous avons réalisé une approche *in vitro* avec l'utilisation principalement du modèle cellulaire P493-6 et une approche *in vivo* comprenant deux volets. Le premier volet concerne l'utilisation du modèle murin  $\lambda$ c-MYC pour l'étude d'une coopération transitoire entre NF- $\kappa$ B et MYC dans le lymphome de Burkitt et le second, la création d'un modèle murin d'ABC-DLBCL sur la base d'une coopération permanente entre les signaux NF- $\kappa$ B et MYC.

Dans cette discussion, nous tâcherons de replacer les principaux résultats obtenus par rapport à la littérature, certains points ayant déjà été évoqués dans le chapitre Résultats.

Les premiers résultats obtenus sur le modèle « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » démontrent clairement une coopération entre MYC et le signal CD40, activateur de NF- $\kappa$ B, puisque la tumorigenèse est plus agressive que chez les animaux simples transgéniques. Nos résultats montrent également une prolifération *ex vivo* Maximale pour les cellules « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC ». L'activation NF- $\kappa$ B, ainsi que l'importance de ce signal dans l'établissement de la tumeur reste à définir. Comme précédemment évoqué, la fréquence d'obtention de ce modèle murin double transgénique est très faible. Cette difficulté d'obtention est sans doute à mettre en rapport avec l'agressivité de ce double génotype qui pourrait conduire à la mort *in utero* ou à la naissance des animaux. Nous allons vérifier cette hypothèse lors des prochains accouplements.

Dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt, notre travail a consisté à étudier et à comprendre les interactions entre l'EBV et MYC. Les études réalisées *in vitro* révèlent une augmentation de l'expression de MYC en présence de la latence III de l'EBV. Ce constat est en cohérence avec les données de la littérature identifiant MYC comme une cible de la protéine virale EBNA2 (Kaiser *et al.*, 1999). Nos résultats montrent aussi que la répression de MYC entraîne une augmentation de l'expression des protéines de la latence III de l'EBV. Seule l'expression de la protéine virale EBNA1, caractéristique de la latence I, reste constante.

L'existence de latences atypiques (avec expression des protéines virales EBNA3A/B/C et EBNA-LP sous la dépendance du promoteur Wp) dans le lymphome de Burkitt endémique

associé à l'EBV favorise l'hypothèse selon laquelle la cellule tumorale dériverait plutôt d'une cellule B en latence III (utilisation des promoteurs Cp et Wp) que directement d'un lymphocyte B mémoire en latence I (utilisation du promoteur Qp) (Kelly *et al.*, 2002). La culture continue des P493-6 en présence de la surexpression de MYC et de la latence III de l'EBV pendant trois semaines a révélé une inhibition complète de l'expression d'EBNA2 et LMP1 dès le dixième jour. Seule l'expression d'EBNA1 est maintenue. Ces résultats montrent clairement le passage de la latence III vers la latence I de l'EBV lorsque MYC est surexprimé. La lignée P493-6 apparaît donc être un modèle *in vitro* de conversion des latences de l'EBV et appuie l'hypothèse selon laquelle la cellule tumorale de lymphome de Burkitt infectée par l'EBV pourrait dériver d'un lymphocyte B en latence III.

Les transcrits EBNA1 sont initiés à partir du promoteur viral Qp dans les cellules de lymphome de Burkitt en latence I et à partir du promoteur Wp puis Cp dans les LCL en latence III (Schaefer *et al.*, 1995). Les cellules P493-6 cultivées en présence seulement de la surexpression de MYC présentent un phénotype proche de celui des cellules de lymphome de Burkitt, et les transcrits EBNA1 sont initiés à partir du promoteur Cp (Pajic *et al.*, 2001). La transcription à partir du promoteur Cp est dépendante de la protéine EBNA2 (Sjöblom *et al.*, 1995), hors dans nos expériences l'expression d'EBNA1 n'est pas modulée par EBNA2. Pour comprendre cette contradiction, nous pourrions étudier l'origine des transcrits EBNA1 (Qp, Cp ou Wp) au bout de trois semaines de culture continue des cellules P493-6 afin de valider complètement le passage de la latence III vers la latence I de l'EBV en terme d'utilisation des promoteurs. Toutefois, quelle que soit l'origine des transcrits EBNA1 dans le modèle P493-6, nos résultats démontrent clairement l'existence d'un « *switch* » protéique et donc le passage d'une latence III vers une latence I en terme d'expression des protéines.

Dans les cellules P493-6, l'inhibition de MYC est corrélée à la diminution de l'isolateur CTCF et son inhibition par siRNA augmente l'expression des protéines EBNA2 et LMP1. Dans ce modèle, la conversion de la latence III vers la latence I de l'EBV par MYC impliquerait donc le répresseur transcriptionnel CTCF. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature qui identifient CTCF comme une cible de MYC et comme un facteur capable de se fixer au génome de l'EBV au niveau d'une séquence située entre l' OriP et le site RBP-Jk du promoteur Cp conduisant à une répression de l'expression de la protéine EBNA2 (Chau *et al.*, 2006). Le rôle de CTCF dans la conversion des latences de l'EBV est controversé. En effet, les travaux de Hughes *et*

*al.* montrent que l'inhibition de l'expression de CTCF, par shRNA dans des lignées de lymphomes de Burkitt en latence I, ne permet pas l'expression des protéines de latence III indiquant que CTCF n'est pas indispensable au maintien de la latence I (Hughes *et al.*, 2012). Cependant, ces mêmes travaux ont également montré que des cellules de lymphome de Burkitt infectées *in vitro* avec un génome EBV ne possédant pas le site de fixation à CTCF ont une activité du promoteur Cp plus élevée et ces cellules mettent plus longtemps à convertir la latence III en latence I (Hughes *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que le facteur CTCF participe, sans pour autant être indispensable, à l'établissement de la latence I. La comparaison du niveau d'expression de MYC entre les cellules P493-6 et des lignées de lymphomes de Burkitt EBV positives (lignées BL2 et BL41) montre une expression de MYC nettement plus importante dans la lignée de P493-6. CTCF étant une cible de MYC, son expression doit donc varier en fonction du modèle cellulaire utilisé ce qui constitue peut-être un paramètre majeur de son degré d'implication dans la répression d'EBNA2, *i.e.* de la latence III. Nous vérifierons cette hypothèse en comparant le niveau d'expression de CTCF entre les cellules P493.6 et des lignées de lymphome de Burkitt infectées par l'EBV.

La méthylation du génome de l'EBV participe également au maintien de la latence I dans les cellules de lymphome de Burkitt. Plusieurs travaux ont mis en évidence une méthylation de résidus CpG au niveau des promoteurs des gènes de la latence III corrélée à une inhibition de la transcription (Robertson *et al.*, 1996 ; Robertson and Ambinder, 1997 ; Salamon *et al.*, 2001). Ainsi, nous pourrions nous intéresser à l'expression d'ADN méthyltransférases dans notre modèle P493-6 afin d'étudier la contribution ce mécanisme dans la répression des gènes de la latence III de l'EBV induite par la surexpression de MYC. Des travaux ont montré que MYC était capable de contrôler l'expression de méthyltransférases telles que EZH2 en réprimant le micro-ARN miR-26a, régulateur négatif de EZH2 (Sander *et al.*, 2008).

Le modèle P493-6 pourrait mimer les étapes précoces et tardives de la lymphomagenèse du lymphome de Burkitt avec MYC dérégulé dans un contexte d'EBV-latence III puis de latence I respectivement. Il existerait une fenêtre temporelle au cours de laquelle l'EBV-latence III et MYC coexistent. Au cours de cette période, nos résultats montrent que la prolifération cellulaire est Maximale et corrélée à une faible apoptose. Les deux approches d'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B que nous avons utilisées ont mis en évidence une diminution de la prolifération indiquant l'implication de cette voie dans l'effet coopératif observé. Le rôle majeur de MYC dans la prolifération cellulaire ainsi que le rôle protecteur de l'EBV vis-à-vis de l'apoptose du fait de



l'activation de la voie NF- $\kappa$ B via son oncogène LMP1 peuvent expliquer ces résultats (Dang, 1999 ; Bouchard *et al.*, 1998 ; Cahir-McFarland *et al.*, 2000). L'ensemble de ces résultats suggère que dans le lymphome de Burkitt, la lymphomagenèse dépendante de MYC nécessite dans ses stades précoces l'activation du facteur NF- $\kappa$ B au travers de la latence III de l'EBV qui viendrait potentialiser l'effet transformant de MYC.

Les cellules tumorales de lymphome de Burkitt sont peu, voire pas reconnues par les cellules T cytotoxiques. Ceci peut s'expliquer en partie par une altération de l'expression des molécules de classes I et II du CMH et des molécules de costimulation (Rooney *et al.*, 1986). La fonction de présentation de l'antigène est également altérée dans les cellules de lymphomes de Burkitt (Frisan *et al.*, 1996). Afin de mieux comprendre l'échappement au système immunitaire des cellules de lymphome de Burkitt, une étude a porté sur l'identification des gènes contribuant au phénotype non immunogène de ces cellules grâce à une analyse du transcriptome. MYC promeut l'échappement au système immunitaire en régulant négativement les gènes de réponse aux interférons via l'inhibition du facteur STAT1 (Schlee *et al.*, 2007a). Ceci est confirmé par nos résultats d'analyse du transcriptome dans les cellules P493-6 exprimant MYC seul. Concernant la signature transcriptomique des cellules P493-6 qui expriment simultanément le programme de latence III de l'EBV et MYC, elle est en faveur d'un métabolisme élevé, d'une prolifération intense et d'une protection des cellules contre la réponse immune. En effet, des gènes impliqués dans la réponse immunitaire se trouvent faiblement exprimés tels que *CCR2* (*CC-Chemokines Receptor 2*) ou encore *CD1D* (*Cluster of Differentiation 1D*) lorsque les deux programmes de prolifération sont conjointement exprimés. CCR2 ainsi que son ligand MCP-1 jouent un rôle dans l'inflammation et le recrutement des monocytes (pour revue Yadav *et al.*, 2010). La molécule CD1d quant à elle intervient dans la présentation de l'antigène aux cellules NKT (pour revue Rossjohn *et al.*, 2012). La nature des molécules dont l'expression est réprimée dans les cellules P493-6 exprimant MYC et la latence III de l'EBV semble indiquer une protection de celles-ci contre la réponse immune innée.

Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la lymphomagenèse dépendante de MYC méritait d'être précisé. En effet, de nombreuses données de la bibliographie décrivent ces deux systèmes comme étant incompatibles dans le lymphome de Burkitt. La faible expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B est reconnue comme étant une caractéristique de ce lymphome (Dave *et al.*, 2006 ; Hummel *et al.*, 2006). D'autre part, MYC régule négativement NF- $\kappa$ B dans des lignées cellulaires de lymphomes

de Burkitt (Schlee *et al.*, 2007a). D'autres travaux ont montré que dans un modèle murin de lymphomagenèse de type Burkitt, l'induction de NF- $\kappa$ B provoque l'apoptose des cellules tumorales (Klapproth *et al.*, 2009). Enfin, plus récemment, une étude a montré que la surexpression de MYC réprime NF- $\kappa$ B2 (p100) ce qui se traduit par une accélération de la lymphomagenèse chez les souris transgéniques E $\mu$ -MYC (Keller *et al.*, 2010). Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque l'activité NF- $\kappa$ B, évaluée grâce à l'expression d'un de ses gènes cibles (TRAF1), est diminuée entre le stade pré-tumoral et le stade tumoral chez les souris  $\lambda$ c-MYC, indiquant que l'activité de cette voie est réduite dans le lymphome de Burkitt. Mais nos travaux apportent aussi la preuve de la compatibilité des deux systèmes MYC et NF- $\kappa$ B et de leur synergie d'action dans les stades précoces de la lymphomagenèse associée au lymphome de Burkitt.

Des travaux ont mis en évidence l'existence d'une coopération entre MYC et la voie de signalisation oncogénique PI3K/AKT dans le processus tumoral associé au lymphome de Burkitt (Sander *et al.*, 2012). La voie PI3K/AKT a été identifiée comme la voie de survie en aval du BCR dans les cellules B matures (Srinivasan *et al.*, 2009). Une autre étude a montré que l'inhibition de la voie PI3K/AKT dans une lignée de lymphome de Burkitt augmente la sensibilité des cellules à la chimiothérapie (Fang *et al.*, 2013). Enfin, l'activation de cette voie semble plus importante dans le lymphome de Burkitt que dans les autres types de lymphomes agressifs (Schmitz *et al.*, 2012). Compte tenu des données bibliographiques concernant l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt, il n'est pas surprenant de retrouver l'activation de cette voie dans les cellules P493-6 exprimant MYC seul. En revanche, l'activation de la voie PI3K/AKT n'est pas plus importante dans les cellules P493-6 exprimant simultanément MYC et la latence III de l'EBV, suggérant que MYC empêche l'activation de cette voie par les protéines virales.

Une autre voie de signalisation inhibée par la surexpression de MYC dans le modèle P493-6 est la voie MAPK/ERK. La régulation de la voie ERK est contrôlée par des phosphatases de la famille DUSP (*Dual Specificity Phosphatase*) capables d'inhiber cette voie de signalisation dans plusieurs types cellulaires (pour revue : Owens and Keyse, 2007). Une étude a montré que les hétérodimères MYC/MAX sont capables d'induire l'expression des phosphatases DUSP2 et 7 impliquées dans la régulation négative de la voie ERK (Chappell *et al.*, 2013). Ce mécanisme de régulation de la voie ERK a été observé dans des cellules souches pluripotentes murines et il

serait intéressant de voir s'il existe dans d'autres modèles cellulaires. Il a également été montré que MYC était capable de bloquer la polymérisation de l'actine en diminuant l'expression de molécules jouant un rôle dans la formation du réseau d'actine (Shiio *et al.*, 2002). Cet effet de MYC sur l'organisation du cytosquelette pourrait être un mécanisme général de régulation négative de l'activité des voies de signalisation cellulaires incluant les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK.

Afin de valider ce modèle de coopération effective entre MYC et la latence III de l'EBV via NF- $\kappa$ B *in vivo*, nous avons utilisé le modèle transgénique  $\lambda$ c-MYC précédemment décrit. Nous avons choisi comme inducteur de la voie NF- $\kappa$ B la signalisation TLR9. La stimulation du TLR9 est pertinente dans le lymphome de Burkitt du fait de la reconnaissance des ADN de l'EBV et du parasite *Plasmodium falciparum* par ce récepteur (Gowda *et al.*, 2012 ; Ning *et al.*, 2011). De plus, les cellules infectées par l'EBV et les cellules de lymphome de Burkitt expriment fortement le TLR9 (Henault *et al.*, 2005). Nos résultats montrent que la sur-expression de MYC augmente la prolifération des splénocytes *ex vivo* suite à la stimulation du TLR9 par rapport à des cellules sauvages uniquement au stade pré-tumoral. Au stade tumoral, deux types de tumeurs émergent : le type A où il n'y a pas de prolifération *ex vivo* sans stimulation, et le type B dont la prolifération est autonome sans stimulation. Ces deux types de cellules tumorales ne répondent pas de la même manière à la stimulation du TLR9. Cette différence peut s'expliquer par l'acquisition d'événements secondaires différents entre les deux types de tumeurs ou par des mutations du TLR9. En effet, des travaux ont identifié des polymorphismes du TLR9 qui conduisent à l'apoptose des lignées de lymphome de Burkitt (Noack *et al.*, 2012).

Il nous reste cependant à démontrer l'implication directe de NF- $\kappa$ B dans la synergie d'action observée entre la signalisation TLR9 et MYC au stade pré-tumoral grâce à l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de cette voie. Toujours dans le but d'étudier l'impact de la voie NF- $\kappa$ B dans l'effet coopératif du TLR9 avec MYC, nous pourrions utiliser le modèle cellulaire P493-6. Ces cellules pourront être stimulées avec des motifs CpG en présence ou en absence de MYC, puis la prolifération ainsi que la survie seront étudiées. La transfection simultanée du super-répresseur I $\kappa$ B $\alpha_{S32;36A}$ , nous permettra d'évaluer le rôle de la voie NF- $\kappa$ B dans les effets observés.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail indiquent que la dérégulation de MYC associée à un signal NF- $\kappa$ B participe à la pathogenèse aussi bien du lymphome de Burkitt que du sous-type ABC des DLBCL. L'expression conjointe de ces deux systèmes fournit un avantage prolifératif et une protection vis-à-vis de l'apoptose dans les étapes précoces du lymphome de Burkitt. La génération du modèle murin « L.CD40<sup>+/-</sup> +  $\lambda$ c-MYC » démontre clairement l'importance des signaux CD40, activateur de NF- $\kappa$ B, et MYC dans le développement d'un ABC-DLBCL. Ces deux lymphomes agressifs sont pourtant deux entités distinctes associées très probablement à des processus lymphomatogènes différents et semblent pourtant impliquer les mêmes voies oncogéniques. La distinction entre ces deux lymphomes B agressifs pourrait tenir dans la temporalité du signal oncogénique NF- $\kappa$ B en d'autre terme « transitoire ou constitutif » coopérant avec MYC dans la transformation.

S'ajoutent probablement l'acquisition de mutations additionnelles différentes ainsi que l'activation et la dérégulation d'autres voies de signalisation distinctes participant à l'hétérogénéité des tumeurs résultantes.

## II. Conclusions

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'existence d'une coopération entre les facteurs MYC et NF- $\kappa$ B dans la transformation lymphocytaire B. Nos résultats concernant le modèle murin « L.CD40<sup>+/-</sup> + Ig $\lambda$ c-MYC » démontre l'existence d'une synergie d'action entre les signaux CD40 et MYC dans le développement d'un lymphome B diffus à grandes cellules de type ABC.

Quant au lymphome de Burkitt, nos différents résultats, obtenus au travers de modèles cellulaires et murins, suggèrent que les étapes précoces de ce lymphome nécessitent un signal NF- $\kappa$ B (fourni *via* l'EBV ou la signalisation du TLR9) qui viendrait potentialiser l'effet transformant de MYC. Ainsi ces travaux permettent une meilleure compréhension de la tumorigenèse associée à ce lymphome agressif. Selon le contexte, la stimulation du TLR9 ne provoque pas les mêmes effets sur les cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC. *In vitro*, la présence d'ODN-CpG conduit à une augmentation de la prolifération des cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC. Ce résultat est également observé *in vivo* mais la stimulation du TLR9 semble aussi initier la mise en place d'une réponse immunitaire non spécifique contre les cellules pré-tumorales  $\lambda$ c-MYC. Ainsi, les travaux sur le rôle du TLR9 dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt, nous ont ouvert de nouvelles perspectives de travail en soulevant la question du contrôle par le microenvironnement immunitaire du pouvoir tumorigène des cellules B activées.

# **Chapitre V**

## **Annexes**



**B7-H1, Which Represses EBV-Immortalized B Cell Killing by Autologous T and NK Cells, Is Oppositely Regulated by MYC and EBV Latency III Program at Both mRNA and Secretory Lysosome Levels.**

Stéphanie Durand-Panteix, Mona Farhat, Ibtissam Youlyouz-Marfak., Pauline Rouaud, Catherine Ouk-Martin, Amandine David, Nathalie Faumont, Jean Feuillard. and Chantal Jayat-Vignoles

*2012, J. Immunol. 189, 181–190.*

Lors de mon arrivée dans le laboratoire en 2009 dans le cadre d'un stage de Master 1, j'ai eu l'occasion de travailler sur l'étude de la molécule de costimulation B7-H1 capable d'inhiber la réponse T en induisant l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Ce travail s'est intéressé à la régulation de B7-H1 par les facteurs NF-κB et c-Myc qui sont les deux principaux facteurs de transcription des cellules B immortalisées par l'EBV. C'est ainsi que j'ai pu modestement contribuer à l'étude de l'expression des transcrits et de la protéine B7-H1 dans des lignées EBV positives présentée dans la Figure 1 de cet article. J'ai également étudié le lien entre B7-H1 et l'apoptose des cellules B immortalisées par l'EBV mais ces résultats ne sont pas présentés ici.





## **RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells.**

Aurélie Chanut, Fanny Duguet, Abdel Marfak, Amandine David, Barbara Petit, Marie Parrens, Stéphanie Durand-Panteix, Mélanie Boulin-Deveza, Nathalie Gachard, Ibtissam Youlyouz-Marfak, Dominique Bordessoule, Jean Feuillard and Nathalie Faumont

*2013, Leukemia*

Au cours de ma thèse, j'ai participé aux travaux du laboratoire qui ont porté sur la détermination des rôles respectifs des sous-unités RelA et RelB respectivement des voies classique et alternative de NF- $\kappa$ B dans les cellules B transformées par l'EBV. Dans un premier temps, les cellules de la lignée EREB2-5 ont été transfectées avec un vecteur inducible codant les sous-unités RelA, ou relB, ou encore leur inhibiteur respectif I $\kappa$ B $\alpha$  ou p100, puis la survie et la prolifération ont été déterminées. L'étude s'est ensuite poursuivie par une analyse transcriptomique à partir de ces lignées et de cas de DLBCL associés à l'EBV pour identifier les cibles respectives de RelA et RelB. Les résultats obtenus ont permis de montrer le rôle majeur de la voie classique NF- $\kappa$ B dans la tumorigenèse des DLBCL associés à l'EBV. Lors de ce travail, j'ai participé à l'étude du mécanisme d'inhibition réciproque entre RelA et RelB présentée en Figure 4 de l'article.



# **Chapitre VI**

## **Références Bibliographiques**



## A

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MYD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143–150.
- Adams, A., and Lindahl, T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1477–1481.
- 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 MYC oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533–538.
- Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., et al. (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by MYC and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409–421.
- Addinger, H.K., Delius, H., Freese, U.K., Clarke, J., and Bornkamm, G.W. (1985). A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* 141, 221–234.
- Agou, F., Courtois, G., Chiaravalli, J., Baleux, F., Coïc, Y.-M., Traincard, F., Israël, A., and Véron, M. (2004). Inhibition of NF-kappa B activation by peptides targeting NF-kappa B essential modulator (nemo) oligomerization. *J. Biol. Chem.* 279, 54248–54257.
- Albert, T., Wells, J., Funk, J.O., Pullner, A., Raschke, E.E., Stelzer, G., Meisterernst, M., Farnham, P.J., and Eick, D. (2001). The chromatin structure of the dual MYC promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J. Biol. Chem.* 276, 20482–20490.
- Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L.C., Rennert, P.D., Hynes, R.O., and Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 195, 233–244.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Ambinder, R.F., Mullen, M.A., Chang, Y.N., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J. Virol.* 65, 1466–1478.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744–750.

Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., and Allday, M.J. (2008). Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor BIM: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27, 421–433.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell. Sci.* 110 ( Pt 3), 369–378.

Armitage J., Mauch P., Harris N., Coiffier B., Dalla-Favera R. (2009) "Non-Hodgkin Lymphomas, second edition

Arunkumar, N., Liu, C., Hang, H., and Song, W. (2013). Toll-like receptor agonists induce apoptosis in mouse B-cell lymphoma cells by altering NF- $\kappa$ B activation. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 360–372.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277, 15028–15034.

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

## **B**

Babcock, G.J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A.D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497–506.

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

Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2008). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the MYC oncoprotein. *J. Virol.* 82, 4082–4090.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., et al. (1998). Enhanced phosphorylation of P53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674–1677.

Baran-Marszak, F., Boukhiar, M., Harel, S., Laguillier, C., Roger, C., Gressin, R., Martin, A., Fagard, R., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., et al. (2010). Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica* 95, 1865–1872.

Barneda-Zahonero, B., Roman-Gonzalez, L., Collazo, O., Mahmoudi, T., and Parra, M. (2012). Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming. *Comp. Funct. Genomics* 2012, 564381.

- Barr, L.F., Campbell, S.E., Diette, G.B., Gabrielson, E.W., Kim, S., Shim, H., and Dang, C.V. (2000). MYC suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* *60*, 143–149.
- Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003). Opposite regulation of MYC and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J. Biol. Chem.* *278*, 2990–2996.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäker, C., Höck, J., Meister, G., and Grässer, F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* *36*, 666–675.
- Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O’Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M., et al. (2007). A fourth IκappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* *128*, 369–381.
- Basak, S., Shih, V.F.-S., and Hoffmann, A. (2008). Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3139–3150.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., and Baltimore, D. (1995). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev.* *9*, 2736–2746.
- Bellan, C., Lazzi, S., Hummel, M., Palumbo, N., de Santi, M., Amato, T., Nyagol, J., Sabattini, E., Lazure, T., Pileri, S.A., et al. (2005). Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* *106*, 1031–1036.
- Bemark, M., and Neuberger, M.S. (2000). The MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt’s lymphoma line. *Oncogene* *19*, 3404–3410.
- 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*, 5216–5224.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991). MAX: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with MYC. *Science* *251*, 1211–1217.
- Blum, K.A., Lozanski, G., and Byrd, J.C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* *104*, 3009–3020.
- Bodescot, M., Brison, O., and Perricaudet, M. (1986). An Epstein-Barr virus transcription unit is at least 84 kilobases long. *Nucleic Acids Res.* *14*, 2611–2620.
- Bonnet, F., Jouvencel, A.-C., Parrens, M., Leon, M.J., Cotto, E., Garrigue, I., Morlat, P., Beylot, J., Fleury, H., and Lafon, M.-E. (2006). A longitudinal and prospective study of Epstein-Barr virus load in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Virol.* *36*, 258–263.
- Borche, L., Lim, A., Binet, J.L., and Dighiero, G. (1990). Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood* *76*, 562–569.
- Borza, C.M., Morgan, A.J., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2004). Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J. Virol.* *78*, 5007–5014.



Bouchard, C., Staller, P., and Eilers, M. (1998). Control of cell proliferation by MYC. *Trends Cell Biol.* *8*, 202–206.

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*, 2775–2787.

Boukhiar, M.-A., Roger, C., Tran, J., Gressin, R., Martin, A., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Ledoux, D., and Baran-Marszak, F. (2013). Targeting early B-cell receptor signaling induces apoptosis in leukemic mantle cell lymphoma. *Exp Hematol Oncol* *2*, 4.

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

Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* *72*, 729–739.

Brady, G., MacArthur, G.J., and Farrell, P.J. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J. Clin. Pathol.* *60*, 1397–1402.

Bren, G.D., Solan, N.J., Miyoshi, H., Pennington, K.N., Pobst, L.J., and Paya, C.V. (2001). Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* *20*, 7722–7733.

Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al. (2005). MYC represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* *24*, 336–346.

Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G., and Hammerschmidt, W. (1996). The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J. Gen. Virol.* *77 ( Pt 11)*, 2807–2818.

Bu, R., Hussain, A.R., Al-Obaisi, K.A.S., Ahmed, M., Uddin, S., and Al-Kuraya, K.S. (2013). Bortezomib inhibits proteasomal degradation of IκBα and induces mitochondrial dependent apoptosis in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*.

Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E., and Longnecker, R. (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with SRC family tyrosine kinases. *J. Virol.* *66*, 5161–5167.

Bützler, C., Zou, X., Popov, A.V., and Brüggemann, M. (1997). Rapid induction of B-cell lymphomas in mice carrying a human IgH/MYC<sub>YAC</sub>. *Oncogene* *14*, 1383–1388.

## C

Cahir McFarland, E.D., Izumi, K.M., and Mosialos, G. (1999). Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* *18*, 6959–6964.

- Cahir-McFarland, E.D., Davidson, D.M., Schauer, S.L., Duong, J., and Kieff, E. (2000). NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 6055–6060.
- Cahir-McFarland, E.D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Henrickson, S.E., Staudt, L.M., and Kieff, E. (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J. Virol.* *78*, 4108–4119.
- Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* *2*, 1103–1108.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* *9*, 405–411.
- Caldwell, R.G., Brown, R.C., and Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J. Virol.* *74*, 1101–1113.
- Canaan, A., Haviv, I., Urban, A.E., Schulz, V.P., Hartman, S., Zhang, Z., Palejev, D., Deisseroth, A.B., Lacy, J., Snyder, M., et al. (2009). EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 22421–22426.
- Canitrot, Y., Frechet, M., Servant, L., Cazaux, C., and Hoffmann, J.S. (1999). Overexpression of DNA polymerase beta: a genomic instability enhancer process. *FASEB J.* *13*, 1107–1111.
- Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T.N., Greten, F.R., Johnson, R., Schmidt, E.V., and Karin, M. (2001). IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* *107*, 763–775.
- Carbone, A., Gloghini, A., and Dotti, G. (2008). EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist* *13*, 577–585.
- Caro, P., Kishan, A.U., Norberg, E., Stanley, I.A., Chapuy, B., Ficarro, S.B., Polak, K., Tondera, D., Gounarides, J., Yin, H., et al. (2012). Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* *22*, 547–560.
- Carrasco, D., Rizzo, C.A., Dorfman, K., and Bravo, R. (1996). The v-rel oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* *15*, 3640–3650.
- Carrasco, D., Perez, P., Lewin, A., and Bravo, R. (1997). IkappaBalpha overexpression delays tumor formation in v-rel transgenic mice. *J. Exp. Med.* *186*, 279–288.
- Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of BCL2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* *20*, 7342–7351.
- Challa, A., Eliopoulos, A.G., Holder, M.J., Burguete, A.S., Pound, J.D., Chamba, A., Grafton, G., Armitage, R.J., Gregory, C.D., Martinez-Valdez, H., et al. (2002). Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells. *Blood* *99*, 3411–3418.
- Chang, D.W., Claassen, G.F., Hann, S.R., and Cole, M.D. (2000). The MYC transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4309–4319.

- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865–1869.
- Chanut, A., Duguet, F., Marfak, A., David, A., Petit, B., Parrens, M., Durand-Panteix, S., Boulin-Deveza, M., Gachard, N., Youlyouz-Marfak, I., et al. (2013). RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia*.
- Chappell, J., Sun, Y., Singh, A., and Dalton, S. (2013). MYC/MAX control ERK signaling and pluripotency by regulation of dual-specificity phosphatases 2 and 7. *Genes Dev.* 27, 725–733.
- Chaturvedi, M.M., Higuchi, M., and Aggarwal, B.B. (1994). Effect of tumor necrosis factors, interferons, interleukins, and growth factors on the activation of NF-kappa B: evidence for lack of correlation with cell proliferation. *Lymphokine Cytokine Res.* 13, 309–313.
- Chau, C.M., Zhang, X.-Y., McMahon, S.B., and Lieberman, P.M. (2006). Regulation of Epstein-Barr virus latency type by the chromatin boundary factor CTCF. *J. Virol.* 80, 5723–5732.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 541–552.
- Chavier, P., Gruffat, H., Chevallier-Greco, A., Buisson, M., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities. *J. Virol.* 63, 607–614.
- Chen, F.E., and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845–6852.
- Chen, A., Divisconte, M., Jiang, X., Quink, C., and Wang, F. (2005). Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J. Virol.* 79, 4506–4509.
- Chen, H., Lee, J.M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M.H., Ambinder, R.F., and Hayward, S.D. (2001). Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J. Virol.* 75, 2929–2937.
- Chen, L., Monti, S., Juszczynski, P., Daley, J., Chen, W., Witzig, T.E., Habermann, T.M., Kutok, J.L., and Shipp, M.A. (2008). SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 2230–2237.
- Chen, Y.-B., Rahemtullah, A., and Hochberg, E. (2007). Primary effusion lymphoma. *Oncologist* 12, 569–576.
- Cheung, W.C., Kim, J.S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R.D., and Janz, S. (2004). Novel targeted deregulation of MYC cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J. Clin. Invest.* 113, 1763–1773.
- Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V., and Alitalo, K. (1997). Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J. Biol. Chem.* 272, 25176–25183.

- Chiron, D., Bekeredjian-Ding, I., Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., and Jigo, G. (2008). Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* *112*, 2205–2213.
- Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995). MYC is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* *270*, 18961–18965.
- Choy, E.Y.-W., Siu, K.-L., Kok, K.-H., Lung, R.W.-M., Tsang, C.M., To, K.-F., Kwong, D.L.-W., Tsao, S.W., and Jin, D.-Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.* *205*, 2551–2560.
- Chu, Y., Vahl, J.C., Kumar, D., Heger, K., Bertossi, A., Wójtowicz, E., Soberon, V., Schenten, D., Mack, B., Reutelschöfer, M., et al. (2011). B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* *117*, 2227–2236.
- Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., and Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* *3*, 958–965.
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W., and Feuillard, J. (2006). EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and P53. *Blood* *107*, 2070–2078.
- Le Clorennec, C., Ouk, T.-S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C.-C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimmer-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J., et al. (2008). Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/FAS with caspase 8-mediated apoptosis. *J. Virol.* *82*, 6721–6733.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). PAX5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* *8*, 463–470.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 9558–9562.
- Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., et al. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* *459*, 717–721.
- Conzen, S.D., Gottlob, K., Kandel, E.S., Khanduri, P., Wagner, A.J., O’Leary, M., and Hay, N. (2000). Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of MYC: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6008–6018.
- Copie-Bergman, C., Gaulard, P., Leroy, K., Briere, J., Baia, M., Jais, J.-P., Salles, G.A., Berger, F., Haioun, C., Tilly, H., et al. (2009). Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J. Clin. Oncol.* *27*, 5573–5579.
- Corcoran, A.E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* *17*, 141–154.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G.M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV)

nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* 64, 1002–1013.

Courtois, G., and Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25, 6831–6843.

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, 4226–4239.

Crossen, P.E., and Morrison, M.J. (1999). Methylation status of the 3rd exon of the MYC oncogene in B-cell malignancies. *Leuk. Res.* 23, 251–253.

## D

Dai, Y., Lawrence, T.S., and Xu, L. (2009). Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. *Am J Transl Res* 1, 1–15.

Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., and Mårtensson, I.-L. (2007). Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282.

Dang, C.V. (1999). MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11.

Dang, C.V., Li, F., and Lee, L.A. (2005). Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? *Cell Cycle* 4, 1465–1466.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The MYC target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264.

Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.-J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 354, 2431–2442.

Davis, J.N., Kucuk, O., and Sarkar, F.H. (1999). Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 35, 167–174.

Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., and Staudt, L.M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 194, 1861–1874.

Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88–92.

Dawson, C.W., Port, R.J., and Young, L.S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 22, 144–153.

- Decker, T., Schneller, F., Sparwasser, T., Tretter, T., Lipford, G.B., Wagner, H., and Peschel, C. (2000). Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 95, 999–1006.
- Dejardin, E. (2006). The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1161–1179.
- Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.-W., Karin, M., Ware, C.F., and Green, D.R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525–535.
- Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007). [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* 23, 67–73.
- Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L.L., Green, D.R., Korner, M., and Baud, V. (2003). RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J. Biol. Chem.* 278, 23278–23284.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T., et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a MYC-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* 38, 1060–1065.
- Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N.P., Guo, G.-R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J.F., et al. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat. Med.* 13, 944–951.
- Ding, B.B., Yu, J.J., Yu, R.Y.-L., Mendez, L.M., Shaknovich, R., Zhang, Y., Cattoretti, G., and Ye, B.H. (2008). Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 111, 1515–1523.
- Dogan, A., Du, M.Q., Aiello, A., Diss, T.C., Ye, H.T., Pan, L.X., and Isaacson, P.G. (1998). Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood* 91, 4708–4714.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- Du, M.-Q., Bacon, C.M., and Isaacson, P.G. (2007). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Pathol.* 60, 1350–1357.
- Dühren-von Minden, M., Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M.P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Köhler, F., et al. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 489, 309–312.
- Dunleavy, K., Pittaluga, S., Czuczman, M.S., Dave, S.S., Wright, G., Grant, N., Shovlin, M., Jaffe, E.S., Janik, J.E., Staudt, L.M., et al. (2009). Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113, 6069–6076.
- Duyao, M.P., Kessler, D.J., Spicer, D.B., Bartholomew, C., Cleveland, J.L., Siekevitz, M., and Sonenshein, G.E. (1992). Transactivation of the MYC promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF kappa B. *J. Biol. Chem.* 267, 16288–16291.

## E

- Edelman, G.M. (1970). The structure and function of antibodies. *Sci. Am.* 223, 34–42.
- Edry, E., and Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J. Immunol.* 173, 4265–4271.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). BIM is a suppressor of MYC-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6164–6169.
- Ehlin-Henriksson, B., Gordon, J., and Klein, G. (2003). B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* 108, 427–430.
- 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, 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 BCL2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5063–5070.
- Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* 11, 435–444.
- Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (2004). The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 4, 360–367.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., and Young, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274, 16085–16096.
- Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* 9, 550–562.
- 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 MYC protein. *Cell* 69, 119–128.
- Evans, P.C., Ovaa, H., Hamon, M., Kilshaw, P.J., Hamm, S., Bauer, S., Ploegh, H.L., and Smith, T.S. (2004). Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem. J.* 378, 727–734.

## 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, 633–651.

- Facchini, L.M., Chen, S., Marhin, W.W., Lear, J.N., and Penn, L.Z. (1997). The MYC negative autoregulation mechanism requires MYC-MAX association and involves the MYC P2 minimal promoter. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 100–114.
- 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*, 49–58.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., et al. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* *102*, 1515–1525.
- Fang, J.-Y., Cheng, Z.-H., Chen, Y.-X., Lu, R., Yang, L., Zhu, H.-Y., and Lu, L.-G. (2004). Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* *10*, 3394–3398.
- Fang, X., Jiang, Y., Feng, L., Chen, H., Zhen, C., Ding, M., and Wang, X. (2013). Blockade of PI3K/AKT pathway enhances sensitivity of Raji cells to chemotherapy through down-regulation of HSP70. *Cancer Cell Int.* *13*, 48.
- Farrell, P.J., Allan, G.J., Shanahan, F., Vousden, K.H., and Crook, T. (1991). P53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J.* *10*, 2879–2887.
- Faumont, N., Le Clorennec, C., Teira, P., Goormachtigh, G., Coll, J., Canitrot, Y., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., Brousset, P., Delsol, G., et al. (2009). Regulation of DNA polymerase beta by the LMP1 oncoprotein of EBV through the nuclear factor-kappaB pathway. *Cancer Res.* *69*, 5177–5185.
- Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 3940–3944.
- Flateau, C., Le Loup, G., and Pialoux, G. (2011). Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *Lancet Infect Dis* *11*, 541–556.
- Flowers, C.R., Sinha, R., and Vose, J.M. (2010). Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin* *60*, 393–408.
- Forsman, A., Rüetschi, U., Ekholm, J., and Rymo, L. (2008). Identification of intracellular proteins associated with the EBV-encoded nuclear antigen 5 using an efficient TAP procedure and FT-ICR mass spectrometry. *J. Proteome Res.* *7*, 2309–2319.
- Frisan, T., Zhang, Q.J., Levitskaya, J., Coram, M., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1996). Defective presentation of MHC class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes in Burkitt's lymphoma cells. *Int. J. Cancer* *68*, 251–258.
- Fukuda, M., and Longnecker, R. (2004). Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *J. Virol.* *78*, 1697–1705.
- Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J. Virol.* *79*, 8655–8660.



## G

- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., and Dalla-Favera, R. (1991). P53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 5413–5417.
- Gandarillas, A., and Watt, F.M. (1997). MYC promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* *11*, 2869–2882.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). MYC suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762–765.
- Gargano, B., Amente, S., Majello, B., and Lania, L. (2007). P-TEFb is a crucial co-factor for MYC transactivation. *Cell Cycle* *6*, 2031–2037.
- Van Gent, M., Griffin, B.D., BERKhoff, E.G., van Leeuwen, D., Boer, I.G.J., Buisson, M., Hartgers, F.C., Burmeister, W.P., Wiertz, E.J., and Rensing, M.E. (2011). EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *J. Immunol.* *186*, 1694–1702.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., and Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* *25*, 6781–6799.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 837–848.
- Gilligan, K., Sato, H., Rajadurai, P., Busson, P., Young, L., Rickinson, A., Tursz, T., and Raab-Traub, N. (1990). Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fRAGment, DJhet, in a nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.* *64*, 4948–4956.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by MYC. *Nature* *421*, 290–294.
- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 2463–2468.
- Gowda, N.M., Wu, X., and Gowda, D.C. (2012). TLR9 and MYD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J. Immunol.* *188*, 5073–5085.
- Grech, A.P., Amesbury, M., Chan, T., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2004). TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity* *21*, 629–642.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K., and Dalla-Favera, R. (1990). Negative autoregulation of MYC gene expression is inactivated in transformed cells. *EMBO J.* *9*, 3913–3922.
- Grønbaek, K., Straten, P.T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M.K., Hansen, N.E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., and Guldberg, P. (1998). Somatic FAS mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* *92*, 3018–3024.

Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 7568–7572.

Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S., and Masucci, M.G. (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 2313–2318.

Gunvén, P., Klein, G., Klein, E., Norin, T., and Singh, S. (1980a). Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. *Int. J. Cancer* *25*, 711–719.

Gunvén, P., Klein, G., Klein, E., Norin, T., and Singh, S. (1980b). Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. *Int. J. Cancer* *25*, 711–719.

Gustafson, W.C., and Weiss, W.A. (2010). MYC proteins as therapeutic targets. *Oncogene* *29*, 1249–1259.

Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5785–5799.

Györy, I., Fejér, G., Ghosh, N., Seto, E., and Wright, K.L. (2003). Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J. Immunol.* *170*, 3125–3133.

Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 561–574.

## H

Habib, T., Park, H., Tsang, M., de Alborán, I.M., Nicks, A., Wilson, L., Knoepfler, P.S., Andrews, S., Rawlings, D.J., Eisenman, R.N., et al. (2007). MYC stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J. Cell Biol.* *179*, 717–731.

Hammerschmidt, W., Sugden, B., and Baichwal, V.R. (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J. Virol.* *63*, 2469–2475.

Hann, S.R., Dixit, M., Sears, R.C., and Sealy, L. (1994). The alternatively initiated MYC proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev.* *8*, 2441–2452.

Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., et al. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* *103*, 275–282.

Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (2012). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Immunol.* *189*, 3271–3283.

- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., and Gatter, K.C. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* *84*, 1361–1392.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269–279.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* *132*, 344–362.
- He, B., Raab-Traub, N., Casali, P., and Cerutti, A. (2003). EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J. Immunol.* *171*, 5215–5224.
- He, L., Liu, J., Collins, I., Sanford, S., O’Connell, B., Benham, C.J., and Levens, D. (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes MYC expression. *EMBO J.* *19*, 1034–1044.
- Hebner, C., Lasanen, J., Battle, S., and Aiyar, A. (2003). The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology* *311*, 263–274.
- Hecht, J.L., and Aster, J.C. (2000). Molecular Biology of Burkitt’s Lymphoma. *JCO* *18*, 3707–3721.
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., and Lowe, S.W. (2005). Evasion of the P53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* *436*, 807–811.
- Henault, M., Lee, L.N., Evans, G.F., and Zuckerman, S.H. (2005). The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG oligonucleotides. *J. Immunol. Methods* *300*, 93–99.
- Henriksson, M., and Lüscher, B. (1996). Proteins of the MYC network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.* *68*, 109–182.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d’ Agay, M.F., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, J.P., Diebold, J., et al. (1996). Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin’s lymphoma. Groupe d’Etude des Lymphomes de l’Adulte (GELA). *Blood* *87*, 265–272.
- Hermine, O., Lefrère, F., Bronowicki, J.-P., Mariette, X., Jondeau, K., Eclache-Saudreau, V., Delmas, B., Valensi, F., Cacoub, P., Brechot, C., et al. (2002). Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* *347*, 89–94.
- Hernandez-Luna, M.A., Rocha-Zavaleta, L., Vega, M.I., and Huerta-Yepez, S. (2013). Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  induces chemoresistance phenotype in non-Hodgkin lymphoma cell line via up-regulation of BCL-XL. *Leuk. Lymphoma* *54*, 1048–1055.
- Hömig-Hölzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Müller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., et al. (2008). Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* *205*, 1317–1329.

Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D.H., Miller, R.A., et al. (2010). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 13075–13080.

Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y., and Seto, M. (2009). TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *114*, 2467–2475.

Huang, X., and Yang, Y. (2010). Targeting the TLR9-MYD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 787–796.

Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K.-L., Chen, Y., Chen, S.-H., Mayer, L., Unkeless, J.C., and Xiong, H. (2005). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* *65*, 5009–5014.

Hueber, A.O., Zörnig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in MYC-induced apoptosis. *Science* *278*, 1305–1309.

Hughes, D.J., Marendy, E.M., Dickerson, C.A., Yetming, K.D., Sample, C.E., and Sample, J.T. (2012). Contributions of CTCF and DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B to Epstein-Barr virus restricted latency. *J. Virol.* *86*, 1034–1045.

Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.-J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10989–10994.

Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F.E., Bernd, H.-W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., et al. (2006). A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2419–2430.

Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E., and Spencer, J. (1996). Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J. Pathol.* *178*, 122–127.

Hymowitz, S.G., and Wertz, I.E. (2010). A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 332–341.

I

Iaccarino, I., Hancock, D., Evan, G., and Downward, J. (2003). MYC induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a BID-dependent manner. *Cell Death Differ.* *10*, 599–608.

Iademarco, M.F., McQuillan, J.J., Rosen, G.D., and Dean, D.C. (1992). Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.* *267*, 16323–16329.

Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y.-M., Kameoka, Y., Takahashi, N., and Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* *113*, 396–402.

Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999). MYC enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 13180–13185.

Ishikawa, H., Carrasco, D., Claudio, E., Ryseck, R.P., and Bravo, R. (1997). Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J. Exp. Med.* *186*, 999–1014.

Isobe, K., Tamaru, J.-I., Nakamura, S., Harigaya, K., Mikata, A., and Ito, H. (2002). VH gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma: somatic mutation and intraclonal diversity with special reference to the tumor cells involving germinal center. *Leuk. Lymphoma* *43*, 159–164.

Israël, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* *10*, 129–133.

Israël, A., Le Bail, O., Hatat, D., Piette, J., Kieran, M., Logeat, F., Wallach, D., Fellous, M., and Kourilsky, P. (1989). TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* *8*, 3793–3800.

Iwai, K. (2012). Diverse ubiquitin signaling in NF- $\kappa$ B activation. *Trends Cell Biol.* *22*, 355–364.

Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M.A., Okamura, N., Huang, Y., and Ohtani, K. (2008). Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* *27*, 5635–5642.

Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *73*, 9908–9916.

## J

Jäättelä, M., Mouritzen, H., Elling, F., and Bastholm, L. (1996). A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J. Immunol.* *156*, 1166–1173.

Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.-H., and Baud, V. (2005). RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 14635–14640.

Jahrsdorfer, B., Mühlhoff, L., Blackwell, S.E., Wagner, M., Poeck, H., Hartmann, E., Jox, R., Giese, T., Emmerich, B., Endres, S., et al. (2005). B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1490–1499.

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*, 2268–2275.

Johansen, L.M., Iwama, A., Lodie, T.A., Sasaki, K., Felsher, D.W., Golub, T.R., and Tenen, D.G. (2001). MYC is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3789–3806.

Johnson, P.W., Watt, S.M., Betts, D.R., Davies, D., Jordan, S., Norton, A.J., and Lister, T.A. (1993). Isolated follicular lymphoma cells are resistant to apoptosis and can be grown in vitro in the CD40/stromal cell system. *Blood* 82, 1848–1857.

Johnson, R.F., Witzel, I.-I., and PERKins, N.D. (2011). P53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF- $\kappa$ B. *Cancer Res.* 71, 5588–5597.

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.

Jung, J., Yi, A.-K., Zhang, X., Choe, J., Li, L., and Choi, Y.S. (2002). Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J. Immunol.* 169, 2368–2373.

Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the I $\kappa$ B gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* 191, 395–402.

## K

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene MYC is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* 73, 4481–4484.

Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2003). MYC recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22, 5707–5711.

Kanda, K., Hu, H.M., Zhang, L., Grandchamps, J., and Boxer, L.M. (2000). NF-kappa B activity is required for the deregulation of MYC expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J. Biol. Chem.* 275, 32338–32346.

Kang, M.-S., Lu, H., Yasui, T., Sharpe, A., Warren, H., Cahir-McFarland, E., Bronson, R., Hung, S.C., and Kieff, E. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 820–825.

Kang, M.-S., Soni, V., Bronson, R., and Kieff, E. (2008). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not cause lymphoma in C57BL/6J mice. *J. Virol.* 82, 4180–4183.

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

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663.

Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., and Szekely, L. (2003). EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int. J. Cancer* 105, 644–653.

- Kato, K., Cantwell, M.J., Sharma, S., and Kipps, T.J. (1998). Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* *101*, 1133–1141.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., et al. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* *459*, 712–716.
- Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2008). P53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat. Cell Biol.* *10*, 611–618.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 9150–9154.
- Keller, U., Huber, J., Nilsson, J.A., Fallahi, M., Hall, M.A., Peschel, C., and Cleveland, J.L. (2010). MYC suppression of Nfkb2 accelerates lymphomagenesis. *BMC Cancer* *10*, 348.
- Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* *8*, 1098–1104.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the MYC gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* *35*, 603–610.
- Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Dürr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W., and Hammerschmidt, W. (1995). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J.* *14*, 88–96.
- Kennedy, G., and Sugden, B. (2003). EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6901–6908.
- Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 14269–14274.
- Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.-L., and Kondo, M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* *201*, 1197–1203.
- Kim, J., Zeller, K.I., Wang, Y., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A., and Dang, C.V. (2004). Evaluation of MYC E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5923–5936.
- 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*, 1177–1188.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., et al. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* *19*, 6742–6750.
- Klapproth, K., and Wirth, T. (2010). Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br. J. Haematol.* *149*, 484–497.

- Klapproth, K., Sander, S., Marinkovic, D., Baumann, B., and Wirth, T. (2009). The IKK2/NF- $\kappa$ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* 114, 2448–2458.
- Klefstrom, J., Arighi, E., Littlewood, T., Jäättelä, M., Saksela, E., Evan, G.I., and Alitalo, K. (1997). Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by MYC involves P53 and impaired NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 16, 7382–7392.
- Klein, G. (1986). Constitutive activation of oncogenes by chromosomal translocations in B-cell derived tumors. *AIDS Res* 2 *Suppl* 1, S167–176.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 22–33.
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J.S., Nadkarni, J.J., Wigzell, H., and Clifford, P. (1968). Surface IgM- $\kappa$  specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* 28, 1300–1310.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* 162, 261–280.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7, 773–782.
- Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S., and Eilers, M. (2006). Mechanisms of transcriptional repression by MYC. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 51–62.
- Knutson, J.C. (1990). The level of FGR RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.* 64, 2530–2536.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 73, 9827–9831.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., et al. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J. Exp. Med.* 192, 1183–1190.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dörfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2662–2672.
- Krauer, K.G., Burgess, A., Buck, M., Flanagan, J., Sculley, T.B., and Gabrielli, B. (2004). The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene* 23, 1342–1353.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5, 471–484.
- Krieg, A.M., Hartmann, G., and Yi, A.K. (2000). Mechanism of action of CpG DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 247, 1–21.
- Krikos, A., Laherty, C.D., and Dixit, V.M. (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J. Biol. Chem.* 267, 17971–17976.



Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 11963–11968.

Kunsch, C., and Rosen, C.A. (1993). NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6137–6146.

Küppers, R. (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv. Cancer Res.* *84*, 277–312.

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

Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* *20*, 5580–5594.

Küppers, R., Rajewsky, K., and Hansmann, M.L. (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1398–1405.

Kurth, J., Hansmann, M.-L., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2003). Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4730–4735.

## L

Laherty, C.D., Hu, H.M., Opiari, A.W., Wang, F., and Dixit, V.M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J. Biol. Chem.* *267*, 24157–24160.

Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelot, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., et al. (2005). Small molecule inhibitors of IkkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* *11*, 28–40.

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

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

Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., and Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* *289*, 2350–2354.

Leight, E.R., and Sugden, B. (2000). EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* *10*, 83–100.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973–983.

Lenz, G., Wright, G.W., Emre, N.C.T., Kohlhammer, H., Dave, S.S., Davis, R.E., Carty, S., Lam, L.T., Shaffer, A.L., Xiao, W., et al. (2008a). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 13520–13525.

- Lenz, G., Davis, R.E., Ngo, V.N., Lam, L., George, T.C., Wright, G.W., Dave, S.S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., et al. (2008b). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319, 1676–1679.
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008c). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 359, 2313–2323.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12616–12621.
- Li, L., Soetandyo, N., Wang, Q., and Ye, Y. (2009). The zinc finger protein A20 targets TRAF2 to the lysosomes for degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 346–353.
- Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 1839–1845.
- Liang, J., and Slingerland, J.M. (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (AKT) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339–345.
- Libermann, T.A., and Baltimore, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2327–2334.
- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). BLIMP1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4771–4780.
- Lindsley, R.C., and LaCasce, A.S. (2012). Biology of double-hit B-cell lymphomas. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 299–304.
- Lindström, M.S., and Wiman, K.G. (2002). Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* 12, 381–387.
- Lindström, M.S., and Wiman, K.G. (2003). MYC and E2F1 induce P53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene* 22, 4993–5005.
- 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, 2171–2177.
- Liou, H.C., Nolan, G.P., Ghosh, S., Fujita, T., and Baltimore, D. (1992). The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.* 11, 3003–3009.
- Liptay, S., Schmid, R.M., Nabel, E.G., and Nabel, G.J. (1994). Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7695–7703.
- Longnecker, R., Miller, C.L., Miao, X.Q., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1993). The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *J. Virol.* 67, 2006–2013.

Lossos, I.S., Czerwinski, D.K., Alizadeh, A.A., Wechser, M.A., Tibshirani, R., Botstein, D., and Levy, R. (2004). Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1828–1837.

Lucas, J.M., Wilkie, N.M., and Lang, J.C. (1993). MYC repression of promoter activity through core promoter elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *194*, 1446–1452.

Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M.-S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B., and Kieff, E. (2004). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 141–146.

Lung, R.W.-M., Tong, J.H.-M., Sung, Y.-M., Leung, P.-S., Ng, D.C.-H., Chau, S.-L., Chan, A.W.-H., Ng, E.K.-O., Lo, K.-W., and To, K.-F. (2009). Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* *11*, 1174–1184.

Luo, Q., Li, J., Cencki, B., and Kretzner, L. (2004). Autorepression of MYC requires both initiator and E2F-binding site elements and cooperation with the p107 gene product. *Oncogene* *23*, 1088–1097.

## M

Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates MYC expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* *8*, 2212–2226.

Magrath, I. (2012). Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br. J. Haematol.* *156*, 744–756.

Mai, S., Fluri, M., Siwarski, D., and Huppi, K. (1996). Genomic instability in MYCER-activated Rat1A-MYCER cells. *Chromosome Res.* *4*, 365–371.

Manjarrez-Orduño, N., Quách, T.D., and Sanz, I. (2009). B cells and immunological tolerance. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 278–288.

Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A., and Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* *65*, 6826–6837.

Marinkovic, D., Marinkovic, T., Mahr, B., Hess, J., and Wirth, T. (2004). Reversible lymphomagenesis in conditionally MYC expressing mice. *Int. J. Cancer* *110*, 336–342.

Marrogi, A., Pass, H.I., Khan, M., Metheny-Barlow, L.J., Harris, C.C., and Gerwin, B.I. (2000). Human mesothelioma samples overexpress both cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (NOS2): in vitro antiproliferative effects of a COX-2 inhibitor. *Cancer Res.* *60*, 3696–3700.

- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.
- Mazzaro, C., Zagonel, V., Monfardini, S., Tulissi, P., Pussini, E., Fanni, M., Sorio, R., Bortolus, R., Crovatto, M., Santini, G., et al. (1996). Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphomas. *Br. J. Haematol.* 94, 544–550.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Franklin, R.A., Abrams, S.L., Chappell, W.H., Wong, E.W.T., Lehmann, B.D., Terrian, D.M., Basecke, J., Stivala, F., et al. (2007). Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and P53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Adv. Enzyme Regul.* 47, 64–103.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379–385.
- Mercurio, F., DiDonato, J.A., Rosette, C., and Karin, M. (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev.* 7, 705–718.
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., et al. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109, 271–280.
- Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* 8, 976–990.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A.T.P., van den Brule, A.J.C., and Meijer, C.J.L.M. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45, 1–36.
- Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B., and Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155–166.
- Miller, G., Robinson, J., Heston, L., and Lipman, M. (1974). Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4006–4010.
- Mohammad, R.M., Al-Katib, A., Aboukameel, A., Doerge, D.R., Sarkar, F., and Kucuk, O. (2003). Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1361–1368.
- MoLYNeux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., and Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234–1244.
- Mond, J.J., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 655–692.
- Montes-Moreno, S., Gonzalez-Medina, A.-R., Rodriguez-Pinilla, S.-M., Maestre, L., Sanchez-Verde, L., Roncador, G., Mollejo, M., García, J.F., Menarguez, J., Montalbán, C., et al. (2010). Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica* 95, 1342–1349.
- Monti, S., Savage, K.J., Kutok, J.L., Feuerhake, F., Kurtin, P., Mihm, M., Wu, B., Pasqualucci, L., Neuberg, D., Aguiar, R.C.T., et al. (2005). Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma

identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 105, 1851–1861.

Mori, N., and PRAGer, D. (1996). Transactivation of the interleukin-1 $\alpha$  promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood* 87, 3410–3417.

Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 42, 181–185.

Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389–399.

Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T. (2005). Positive and negative regulation of nuclear factor- $\kappa$ B-mediated transcription by I $\kappa$ B $\zeta$ , an inducible nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 280, 7444–7451.

Mourcin, F., Pangault, C., Amin-Ali, R., Amé-Thomas, P., and Tarte, K. (2012). Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis. *Front Immunol* 3, 280.

Mu, P., Han, Y.-C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogdowski, P., de Stanchina, E., D'Andrea, A., Sander, C., and Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in MYC-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* 23, 2806–2811.

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, 18470–18476.

Murphy, M.J., Wilson, A., and Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: MYC function in stem cells. *Trends Cell Biol.* 15, 128–137.

## N

Nadel, B., Marculescu, R., Le, T., Rudnicki, M., Böcskör, S., and Jäger, U. (2001). Novel insights into the mechanism of t(14;18)(q32;q21) translocation in follicular lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 42, 1181–1194.

Nagel, D., Spranger, S., Vincendeau, M., Grau, M., Raffegerst, S., Kloo, B., Hlahla, D., Neuenschwander, M., Peter von Kries, J., Hadian, K., et al. (2012). Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell* 22, 825–837.

Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Cloennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphaël, M., Feuillard, J., et al. (2005). Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF- $\kappa$ B-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 79, 4936–4943.

Nanbo, A., Sugden, A., and Sugden, B. (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J.* 26, 4252–4262.

Neri, A., Barriga, F., Knowles, D.M., Magrath, I.T., and Dalla-Favera, R. (1988). Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 2748–2752.

Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., et al. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* *441*, 106–110.

Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., et al. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* *470*, 115–119.

Niller, H.H., Salamon, D., Ilg, K., Koroknai, A., Banati, F., Bauml, G., Rucker, O., Schwarzmann, F., Wolf, H., and Minarovits, J. (2003). The in vivo binding site for oncoprotein MYC in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. *Med. Sci. Monit.* *9*, HY1–9.

Niller, H.H., Salamon, D., Banati, F., Schwarzmann, F., Wolf, H., and Minarovits, J. (2004). The LCR of EBV makes Burkitt's lymphoma endemic. *Trends Microbiol.* *12*, 495–499.

Ning, S. (2011). Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae* *2*, 1.

Noack, J., Jordi, M., Zauner, L., Alessi, D., Burch, A., Tinguely, M., Hersberger, M., Bernasconi, M., and Nadal, D. (2012). TLR9 agonists induced cell death in Burkitt's lymphoma cells is variable and influenced by TLR9 polymorphism. *Cell Death Dis* *3*, e323.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.

Nolan, G.P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H.C., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1993). The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3557–3566.

Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A., and Sample, J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J. Virol.* *70*, 623–627.

## O

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). MYC-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839–843.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C., and Strauss, J.F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* *276*, 10229–10233.

Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.-J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* *23*, 2839–2849.

Opipari, A.W., Jr, Boguski, M.S., and Dixit, V.M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* 265, 14705–14708.

Opipari, A.W., Jr, Hu, H.M., Yabkowitz, R., and Dixit, V.M. (1992). The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267, 12424–12427.

Oster, S.K., Ho, C.S.W., Soucie, E.L., and Penn, L.Z. (2002). The MYC oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv. Cancer Res.* 84, 81–154.

Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26, 3203–3213.

## P

Pai, S., and Khanna, R. (2001). Role of LMP1 in immune control of EBV infection. *Semin. Cancer Biol.* 11, 455–460.

Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., et al. (2000). Cell cycle activation by MYC in a burkitt lymphoma model cell line. *Int. J. Cancer* 87, 787–793.

Pajic, A., Polack, A., Staeger, M.S., Spitkovsky, D., Baier, B., Bornkamm, G.W., and Laux, G. (2001b). Elevated expression of MYC in lymphoblastoid cells does not support an Epstein-Barr virus latency III-to-I switch. *J. Gen. Virol.* 82, 3051–3055.

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/MYC translocus is independent of the heavy chain intron enhancer (Emu). *Cancer Res.* 59, 5625–5628.

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., et al. (2005a). Insertion of MYC into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res.* 65, 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, 7644–7652.

Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., et al. (1998). BCL6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 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, 341–346.

Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., and Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 203, 311–317.

Peebles, R.S., Maliszewski, C.R., Sato, T.A., Hanley-Hyde, J., Maroulakou, I.G., Hunziker, R., Schneck, J.P., and Green, J.E. (1995). Abnormal B-cell function in HTLV-I-tax transgenic mice. *Oncogene* 10, 1045–1051.

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., Khan, M., and Evan, G. (2002a). MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 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, 321–334.

Penot, A. (2012). Inégalités territoriales, parcours de soins et survie des patients atteints d'un lymphome B de haut grade de malignité en Limousin. Thèse de doctorat en médecine. Limoges, Université de Limoges.

Perry, J.A., Olver, C.S., Burnett, R.C., and Avery, A.C. (2005). Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J. Immunol.* 174, 5921–5925.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734–736.

Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P., Terry, N., Reid, P.S., and Ford, R.J. (2002). A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity* 16, 37–50.

Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lin-Lee, Y.-C., and Ford, R.J. (2005). Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* 106, 3940–3947.

Podar, K., Tonon, G., Sattler, M., Tai, Y.-T., Legouill, S., Yasui, H., Ishitsuka, K., Kumar, S., Kumar, R., Pandite, L.N., et al. (2006). The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19478–19483.

Pozzato, G., Mazzaro, C., Crovatto, M., Modolo, M.L., Ceselli, S., Mazzi, G., Sulfaro, S., Franzin, F., Tulissi, P., and Moretti, M. (1994). Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 84, 3047–3053.

Pratt, Z.L., Kuzembayeva, M., Sengupta, S., and Sugden, B. (2009). The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology* 386, 387–397.

Prochownik, E.V., and Li, Y. (2007). The ever expanding role for MYC in promoting genomic instability. *Cell Cycle* 6, 1024–1029.

## R

Radcliffe, C.M., Arnold, J.N., Suter, D.M., Wormald, M.R., Harvey, D.J., Royle, L., Mimura, Y., Kimura, Y., Sim, R.B., Inogès, S., et al. (2007). Human follicular lymphoma cells contain



oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 7405–7415.

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 MYC/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**, 431–438.

Rastelli, J., Hömig-Hölzel, C., Seagal, J., Müller, W., Hermann, A.C., Rajewsky, K., and Zimmer-Strobl, U. (2008). LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood* **111**, 1448–1455.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383–384.

Ricci, M.S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2004). Direct repression of FLIP expression by MYC is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8541–8555.

Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in MYC that lead to MYC/IgH translocations. *Cell* **135**, 1028–1038.

Robertson, K.D., and Ambinder, R.F. (1997). Mapping promoter regions that are hypersensitive to methylation-mediated inhibition of transcription: application of the methylation cassette assay to the Epstein-Barr virus major latency promoter. *J. Virol.* **71**, 6445–6454.

Robertson, E.S., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1994). An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J. Virol.* **68**, 1449–1458.

Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E. (1996a). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* **70**, 3068–3074.

Robertson, K.D., Manns, A., Swinnen, L.J., Zong, J.C., Gulley, M.L., and Ambinder, R.F. (1996b). CpG methylation of the major Epstein-Barr virus latency promoter in Burkitt's lymphoma and Hodgkin's disease. *Blood* **88**, 3129–3136.

Rooney, C.M., Gregory, C.D., Rowe, M., Finerty, S., Edwards, C., Rupani, H., and Rickinson, A.B. (1986). Endemic Burkitt's lymphoma: phenotypic analysis of tumor biopsy cells and of derived tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 681–687.

Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., and Steitz, J.A. (1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 785–796.

La Rosa, F.A., Pierce, J.W., and Sonenshein, G.E. (1994). Differential regulation of the MYC oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1039–1044.

Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltnane, J.M., et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1937–1947.

Rossi, D., Ciardullo, C., and Gaidano, G. (2013). Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: Revelations from next generation sequencing studies. *Semin. Cancer Biol.* 23, 422–430.

Rossjohn, J., Pellicci, D.G., Patel, O., Gapin, L., and Godfrey, D.I. (2012). Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 845–857.

Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S., et al. (2004). CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses in vitro. *Blood* 103, 2162–2169.

Rovedo, M., and Longnecker, R. (2007). Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J. Virol.* 81, 84–94.

Rowley, R.B., Burkhardt, A.L., Chao, H.G., Matsueda, G.R., and Bolen, J.B. (1995). SYK protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 11590–11594.

Ruminy, P., Etancelin, P., Couronné, L., Parmentier, F., Rainville, V., Mareschal, S., Bohers, E., Burgot, C., Cornic, M., Bertrand, P., et al. (2011). The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 25, 681–688.

Ryan, K.M., and Birnie, G.D. (1996). MYC oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* 314 ( Pt 3), 713–721.

## S

Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., and Robertson, E.S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments MDM2-mediated P53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating MDM2. *J. Virol.* 83, 4652–4669.

Saha, A., Halder, S., Upadhyay, S.K., Lu, J., Kumar, P., Murakami, M., Cai, Q., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C facilitates G1-S transition by stabilizing and enhancing the function of cyclin D1. *PLoS Pathog.* 7, e1001275.

Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2003). Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J. Biol. Chem.* 278, 46565–46575.

Salamon, D., Takacs, M., Ujvari, D., Uhlig, J., Wolf, H., Minarovits, J., and Niller, H.H. (2001). Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency-associated promoters Qp, Cp, and LMP1p of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 75, 2584–2596.

Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (1999). Destruction of MYC by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize MYC. *EMBO J.* 18, 717–726.

- Salles, G., de Jong, D., Xie, W., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., Klapper, W., Calaminici, M., Sander, B., Thorns, C., et al. (2011). Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* *117*, 7070–7078.
- Samitas, K., Lötvall, J., and Bossios, A. (2010). B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *58*, 209–225.
- Sander, S., Bullinger, L., and Wirth, T. (2009). Repressing the repressor: a new mode of MYC action in lymphomagenesis. *Cell Cycle* *8*, 556–559.
- Sander, S., Calado, D.P., Srinivasan, L., Köchert, K., Zhang, B., Rosolowski, M., Rodig, S.J., Holzmann, K., Stilgenbauer, S., Siebert, R., et al. (2012). Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* *22*, 167–179.
- Sanjuan, M.A., Rao, N., Lai, K.-T.A., Gu, Y., Sun, S., Fuchs, A., Fung-Leung, W.-P., Colonna, M., and Karlsson, L. (2006). CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J. Cell Biol.* *172*, 1057–1068.
- Saridakis, V., Sheng, Y., Sarkari, F., Holowaty, M.N., Shire, K., Nguyen, T., Zhang, R.G., Liao, J., Lee, W., Edwards, A.M., et al. (2005). Structure of the P53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol. Cell* *18*, 25–36.
- Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 10565–10569.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 251–263.
- Schlee, M., Hölzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., et al. (2007a). MYC activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int. J. Cancer* *120*, 1387–1395.
- Schlee, M., Schuhmacher, M., Hölzel, M., Laux, G., and Bornkamm, G.W. (2007b). MYC impairs immunogenicity of human B cells. *Adv. Cancer Res.* *97*, 167–188.
- Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., et al. (2012). Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* *490*, 116–120.
- Schmukle, A.C., and Walczak, H. (2012). No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF-κB activity. *J. Cell. Sci.* *125*, 549–559.
- Schroeder, H.W., Jr, and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41–52.
- Scuto, A., Kujawski, M., Kowolik, C., Krymskaya, L., Wang, L., Weiss, L.M., Digiusto, D., Yu, H., Forman, S., and Jove, R. (2011). STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* *71*, 3182–3188.

- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921–928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., et al. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495–1499.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822–829.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000). BCL6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199–212.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., and Staudt, L.M. (2002). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 920–932.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of BLIMP1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.
- Shaffer, A.L., 3rd, Young, R.M., and Staudt, L.M. (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 565–610.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 230–242.
- Shembade, N., and Harhaj, E. (2010). A20 inhibition of NFkB and inflammation: targeting E2:E3 ubiquitin enzyme complexes. *Cell Cycle* 9, 2481–2482.
- Shembade, N., Ma, A., and Harhaj, E.W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 327, 1135–1139.
- Shih, V.F.-S., Tsui, R., Caldwell, A., and Hoffmann, A. (2011). A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 21, 86–102.
- Shiio, Y., Donohoe, S., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Eisenman, R.N. (2002). Quantitative proteomic analysis of MYC oncoprotein function. *EMBO J.* 21, 5088–5096.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y., and Takada, K. (1994). Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J. Virol.* 68, 6069–6073.
- Shipp, M.A. (1994). Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood* 83, 1165–1173.
- Shou, Y., Li, N., Li, L., Borowitz, J.L., and Isom, G.E. (2002). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and BAX contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J. Neurochem.* 81, 842–852.
- Silvestri, F., Barillari, G., Fanin, R., Salmaso, F., Pipan, C., Falasca, E., Puglisi, F., Mariuzzi, L., Zaja, F., Infanti, L., et al. (1998). Impact of hepatitis C virus infection on clinical features, quality of life

and survival of patients with lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma. *Ann. Oncol.* **9**, 499–504.

Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **13**, 3321–3328.

Sjöblom, A., Nerstedt, A., Jansson, A., and Rymo, L. (1995). Domains of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) involved in the transactivation of the latent membrane protein 1 and the EBNA Cp promoters. *J. Gen. Virol.* **76** ( Pt 11), 2669–2678.

Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., and Chen, Z.J. (2011). Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol. Cell* **44**, 559–571.

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**, 317–323.

Solan, N.J., Miyoshi, H., Carmona, E.M., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J. Biol. Chem.* **277**, 1405–1418.

Song, H.Y., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6721–6725.

Soni, V., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2007). LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* **597**, 173–187.

Soucie, E.L., Annis, M.G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D.W., and Penn, L.Z. (2001). MYC potentiates apoptosis by stimulating BAX activity at the mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4725–4736.

Srinivas, S.K., and Sixbey, J.W. (1995). Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 and RAG2. *J. Virol.* **69**, 8155–8158.

Staege, M.S., Lee, S.P., Frisan, T., Mautner, J., Scholz, S., Pajic, A., Rickinson, A.B., Masucci, M.G., Polack, A., and Bornkamm, G.W. (2002). MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4550–4555.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J., Hänel, F., et al. (2001). Repression of p15INK4b expression by MYC through association with Miz-1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 392–399.

Stamenkovic, I., Clark, E.A., and Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* **8**, 1403–1410.

Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000109.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., and Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **188**, 211–216.

Van de Stolpe, A., and van der Saag, P.T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* *74*, 13–33.

Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between MYC and BCL2. *Nature* *348*, 331–333.

Sun, S.C., and Ballard, D.W. (1999). Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene* *18*, 6948–6958.

Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G., and Wiman, K.G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and P53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 5455–5459.

## T

Takada, K., and Nanbo, A. (2001). The role of EBERs in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *11*, 461–467.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.

Tam, W., Gomez, M., Chadburn, A., Lee, J.W., Chan, W.C., and Knowles, D.M. (2006). Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* *107*, 4090–4100.

Tamaru, J., Hummel, M., Marafioti, T., Kalvelage, B., Leoncini, L., Minacci, C., Tosi, P., Wright, D., and Stein, H. (1995). Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations. *Am. J. Pathol.* *147*, 1398–1407.

Tangye, S.G., and Tarlinton, D.M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2065–2075.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* *50*, 203–213.

Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1328–1337.

Thorley-Lawson, D.A., Duca, K.A., and Shapiro, M. (2008). Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. *Trends Immunol.* *29*, 195–201.

Thorley-Lawson, D.A., Hawkins, J.B., Tracy, S.I., and Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* *3*, 227–232.

Timms, J.M., Bell, A., Flavell, J.R., Murray, P.G., Rickinson, A.B., Traverse-Glehen, A., Berger, F., and Delecluse, H.-J. (2003). Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* *361*, 217–223.

Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., and Delpy, L. (2012). Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 107–117.

Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *67*, 2014–2025.

Toualbi, K., Güller, M.C., Mauriz, J.-L., Labalette, C., Buendia, M.-A., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2007). Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene* *26*, 3492–3502.

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 MYC transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* *179*, 6033–6042.

Tsimbouri, P., Drotar, M.E., Coy, J.L., and Wilson, J.B. (2002). BCL-XL and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene* *21*, 5182–5187.

Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Sasaki, Y., Takahama, M., and Konishi, Y. (1999). Hypomethylation of CpG sites and MYC gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* *90*, 909–913.

Tsurumi, T., Fujita, M., and Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev. Med. Virol.* *15*, 3–15.

Tucker, E., O'Donnell, K., Fuchsberger, M., Hilton, A.A., Metcalf, D., Greig, K., Sims, N.A., Quinn, J.M., Alexander, W.S., Hilton, D.J., et al. (2007). A novel mutation in the Nfkb2 gene generates an NF-kappa B2 "super repressor." *J. Immunol.* *179*, 7514–7522.

Turner, C.A., Jr, Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). BLIMP1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* *77*, 297–306.

## U

Umetsu, D.T., Esserman, L., Donlon, T.A., DeKruyff, R.H., and Levy, R. (1990). Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J. Immunol.* *144*, 2550–2557.

Urban, B.C., and Roberts, D.J. (2003). Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. *J. Exp. Med.* *197*, 137–141.

## V

Valera, A., López-Guillermo, A., Cardesa-Salzman, T., Climent, F., González-Barca, E., Mercadal, S., Espinosa, I., Novelli, S., Briones, J., Mate, J.L., et al. (2013). MYC protein expression and

genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 98, 1554–1562.

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

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J.M. (1982). Isolation and characterization of MYC, a cellular homolog of the oncogene (v-MYC) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J. Virol.* 42, 773–779.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., ERKeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., et al. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875–886.

Vereide, D.T., and Sugden, B. (2011). Lymphomas differ in their dependence on Epstein-Barr virus. *Blood* 117, 1977–1985.

Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., Dikic, I., and Beyaert, R. (2012). A20 inhibits LUBAC-mediated NF-κB activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *EMBO J.* 31, 3845–3855.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9, 2723–2735.

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

Vilaysane, A., and Muruve, D.A. (2009). The innate immune response to DNA. *Semin. Immunol.* 21, 208–214.

Viswanatha, D.S., and Dogan, A. (2007). Hepatitis C virus and lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 60, 1378–1383.

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

De Vita, S., Sacco, C., Sansonno, D., Gloghini, A., Dammacco, F., Crovatto, M., Santini, G., Dolcetti, R., Boiocchi, M., Carbone, A., et al. (1997). Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood* 90, 776–782.

Vonderheide, R.H., Dutcher, J.P., Anderson, J.E., Eckhardt, S.G., Stephans, K.F., Razvillas, B., Garl, S., Butine, M.D., Perry, V.P., Armitage, R.J., et al. (2001). Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 19, 3280–3287.

## W



- Wade, M., and Allday, M.J. (2000). Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1344–1360.
- Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. (1996). Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J. Virol.* *70*, 5909–5915.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr (1998a). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* *281*, 1680–1683.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr (1998b). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* *281*, 1680–1683.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* *43*, 831–840.
- Wang, P., Qiu, W., Dudgeon, C., Liu, H., Huang, C., Zambetti, G.P., Yu, J., and Zhang, L. (2009). PUMA is directly activated by NF-kappaB and contributes to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *16*, 1192–1202.
- Weigel, R., Fischer, D.K., Heston, L., and Miller, G. (1985). Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr virus replication. *J. Virol.* *53*, 254–259.
- Weil, R., Laurent-Winter, C., and Israël, A. (1997). Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 9942–9949.
- Weiner, G.J. (2000). The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 455–463.
- Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., and Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* *320*, 502–506.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J.E., Grim, J.A., Harper, J.W., Eisenman, R.N., and Clurman, B.E. (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent MYC protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 9085–9090.
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* *205*, 1331–1342.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., et al. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* *430*, 694–699.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R., and Israël, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* *16*, 1413–1426.
- Wierstra, I., and Alves, J. (2008). The MYC promoter: still Mystery and challenge. *Adv. Cancer Res.* *99*, 113–333.

Wilda, M., Bruch, J., Harder, L., Rawer, D., Reiter, A., Borkhardt, A., and Woessmann, W. (2004). Inactivation of the ARF-MDM2-P53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* 18, 584–588.

Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1725–1729.

Wooldridge, J.E., and Weiner, G.J. (2003). CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response. *Curr Opin Oncol* 15, 440–445.

Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., and Isaacson, P.G. (1993). Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342, 575–577.

Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E.H., Wiestner, A., and Staudt, L.M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9991–9996.

Wu, K.J., Polack, A., and Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by MYC. *Science* 283, 676–679.

Wu, Y., Maruo, S., Yajima, M., Kanda, T., and Takada, K. (2007). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. *J. Virol.* 81, 11236–11245.

Wulczyn, F.G., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene *bcl-3* encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 358, 597–599.

## Y

Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of MYC is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* 23, 2116–2125.

Yadav, A., Saini, V., and Arora, S. (2010). MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta* 411, 1570–1579.

Yamamoto, M., and Takeda, K. (2008). Role of nuclear I kappa B proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265–269.

Yamamoto, S., Yamamoto, K., Kurobe, H., Yamashita, R., Yamaguchi, H., and Ueda, N. (1998). Transcriptional regulation of fatty acid cyclooxygenases-1 and -2. *Int J Tissue React* 20, 17–22.

Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., et al. (2004). A signalling pathway controlling MYC degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 308–318.

Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 4, 757–768.

Young, R.M., and Staudt, L.M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 12, 229–243.

Young, K.H., Leroy, K., Møller, M.B., Colleoni, G.W.B., Sánchez-Beato, M., Kerbauy, F.R., Haioun, C., Eickhoff, J.C., Young, A.H., Gaulard, P., et al. (2008). Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 112, 3088–3098.

## Z

Zauner, L., Melroe, G.T., Sigrist, J.A., Rechsteiner, M.P., Dorner, M., Arnold, M., Berger, C., Bernasconi, M., Schaefer, B.W., Speck, R.F., et al. (2010). TLR9 triggering in Burkitt's lymphoma cell lines suppresses the EBV BZLF1 transcription via histone modification. *Oncogene* 29, 4588–4598.

Zhang, B., Kracker, S., Yasuda, T., Casola, S., Vanneman, M., Hömig-Hölzel, C., Wang, Z., Derudder, E., Li, S., Chakraborty, T., et al. (2012). Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein-Barr virus protein LMP1 in a mouse model. *Cell* 148, 739–751.

Zhang, J., Sattler, M., Tonon, G., Grabher, C., LabaBIDi, S., Zimmerhackl, A., Raab, M.S., Vallet, S., Zhou, Y., Cartron, M.-A., et al. (2009). Targeting angiogenesis via a MYC/hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent pathway in multiple myeloma. *Cancer Res.* 69, 5082–5090.

Zimber-Strobl, U., and Strobl, L.J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.* 11, 423–434.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). MYC signaling via the ARF tumor suppressor regulates P53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424–2433.