

Université de Limoges

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

UMR 7276 Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Onco-hématologie

Présentée et soutenue par
Nicolas Arnaud

Le 15 décembre 2017

**Les lymphomes B diffus à grandes cellules de type activé : rôle de
NF- κ B et de c-Myc.**

Thèse dirigée par le Docteur Nathalie FAUMONT et le Professeur Jean FEUILLARD

JURY :

Présidente du jury

Mme. Danielle TROUDAUD, PU, EA 3842, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Véronique BAUD, DR INSERM, EA 7324, Université Paris Descartes

Mme. Marie-Hélène DELFAU-LARUE, PU-PH, Hôpital Henri Mondor Créteil

Examineur

M. David RIZZO, MCU-PH, UMR CNRS 7276 CRIBL, CHU Dupuytren, Université de Limoges

Invités

Mme. Nathalie FAUMONT, MCU, UMR CNRS 7276 CRIBL, Université de Limoges

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, UMR CNRS 7276 CRIBL, CHU Dupuytren, Université de Limoges





« There is nothing noble in being superior to your fellow man; true nobility is being superior to your former self. »

Ernest Hemingway

« And why do we fall, Bruce? So we can learn to pick ourselves up. »

Thomas Wayne



Remerciements

Je remercie en premier lieu le Pr Michel Cogné de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche.

Je tiens à remercier le Pr Jean Feuillard pour m'avoir permis de réaliser une thèse et surtout de la finir.

Mes remerciements vont également au Dr Nathalie Faumont qui a co-dirigé ce doctorat. Merci de m'avoir fait confiance en me confiant ce sujet de thèse il y a déjà pas mal de temps. Merci pour tes conseils durant ces années.

Je remercie le Dr Véronique Baud et le Pr Marie-Hélène Delfau-Larue d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie également le Pr Danielle Troutaud et le Dr David Rizzo d'examiner ce travail.

Bon, on va commencer la lourde tâche des remerciements en espérant n'oublier personne.

Alors tout d'abord commençons par le commencement, un immense merci à Amandine de m'avoir tout appris sur les « rouages de la guerre » quand je suis arrivé en thèse. Tu m'as permis de partir sur d'excellentes bases. Merci pour ta patience et toutes tes explications.

Toutes ces années sans toi au labo n'auraient pas été les mêmes, merci à Magali pour *i)* les crumbles, *ii)* ta capacité à croire tout ce qu'on peut raconter, *iii)* ta pitié quand tu me voyais marcher comme un malheureux sous la pluie.

Merci également aux autres membres de la « team », Amanda et Estelle. Je ne vous remercierai jamais assez pour ces inoubliables repas du midi avec son lot de conversations aux sujets « originaux ».

Après la « team », je tenais à remercier Oussama pour sa bonne humeur et ses goûts spéciaux en matière de cinéma. Et merci de m'avoir aidé techniquement surtout le 19/02/15.

N'oublions pas les membres du « *dream office* », Emilie et Racha. Merci d'avoir supporté mon humour plus que douteux durant ces derniers mois.



Merci à Christelle d'avoir fait de la garderie à Munich et Copenhague. Merci à Robin pour son humour encore plus amphibologique que le mien. Merci à Chantal pour tes looooooongues conversations sur les ragots. Merci à Cathy et Valéria pour ces années.

Ensuite, un grand merci à l'ensemble de l'équipe du « 3^{ème} », Je ne vais pas me lancer dans une liste détaillée je vais en oublier sinon. Mais je tenais à remercier particulièrement les membres du club mots fléchés du midi.

Je remercie également le directeur de l'école doctorale, Bertrand Courtioux, pour m'avoir permis de continuer.

D'un point de vue personnel, beaucoup de personnes ont marqué ma vie durant ces années limougeaudes. Je tenais à remercier Claire B de m'avoir supporté et fait découvrir le thermomix et les plats qui vont avec, ainsi que la ville de Strasbourg. Merci également à Laura d'avoir partagé son amour de la Bavière et de München et de m'avoir fait découvrir les joies du BSB. Je remercie également Marine et Marie de m'avoir fait sortir et connaître d'autres personnes et en particulier Emilie Cookie qui m'a mis en PLS un peu trop de fois.

Que serait ces remerciements sans remercier mes amis, Ines et Louis. Je pense que je ne pourrai jamais assez vous remercier. Merci pour ces inoubliables voyages, ces fous rires, votre soutien, ton humour Louis. Ces années n'auraient vraiment pas été les mêmes sans ce groupe « Norwich-Limoges-Reims » à passer des heures à se plaindre et partager nos vies. Un immense merci à vous deux.

Merci à mes amis de lycée qui ont toujours été là, ou pas très loin. Anaïs, Aurélie, Thomas, Gaël, Papy et Bastien.

Un grand merci également à Maxime pour ses partages de dossiers étranges par SMS.

Et pour finir, je tiens à remercier ma famille sans qui je ne serai pas ce que je suis. Merci à SUPERMOUNE de m'avoir soutenu, encouragé et aidé, en particulier cette dernière année.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Abréviations	10
Avant-propos.....	15
Chapitre I. Introduction	16
I.1. Le facteur de transcription c-Myc.....	16
I.1.1. Organisation du gène <i>c-myc</i>	16
I.1.2. C-Myc : rôle de facteur de transcription.....	17
I.1.3. Régulation transcriptionnelle de l'expression de c-Myc	19
I.1.4. Régulation post traductionnelle de c-Myc.	22
I.1.5. Rôles et cibles de c-Myc dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.	24
I.1.5.1. C-Myc et prolifération cellulaire / croissance cellulaire.	25
I.1.5.2. C-Myc et apoptose.	27
I.1.6. C-Myc et lymphomagenèse B.	29
I.1.6.1. C-Myc et lymphome de Burkitt.	29
I.1.6.2. C-Myc et lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL : <i>diffuse large B-cell lymphoma</i>).	33
I.1.6.3. C-Myc et myélome multiple (MM).....	35
I.1.7. Modèles murins de lymphomagenèse c-Myc dépendant.	36
I.1.7.1. Le modèle E μ -myc.	37
I.1.7.2. Le modèle Ig λ -myc.	39
I.1.7.3. Le modèle c-myc-3'IgH LCR.	40
I.1.7.4. Le modèle IgH/c-mycYAC.	41
I.1.7.5. Le modèle iMyc ^{Cα}	43
I.1.7.6. Le modèle iMyc ^{Eμ}	44
I.1.7.7. Le modèle V κ *Myc.	45
I.1.7.8. Le modèle tTA/Myc.	46
I.1.7.9. Le modèle Rosa26Stop ^{F^L} MYC.	47
I.1.7.10. Conclusions sur les différents modèles murins.....	48
I.2. Le facteur de transcription NF- κ B.....	50
I.2.1. Les sous-unités NF- κ B	51
I.2.2. Les inhibiteurs I κ B.	52
I.2.3. Les voies d'activation de NF- κ B.	53
I.2.3.1. La voie d'activation classique.....	53
I.2.3.2. La voie d'activation alterne.....	58
I.2.3.3. L'activation de NF- κ B par LMP1.	60
I.2.4. Points de rétrocontrôle négatif.	61
I.2.4.1. p100, p105, et les protéines I κ Bs.	61
I.2.4.2. La protéine A20.	62
I.2.4.3. La protéine CYLD.	63
I.2.5. Fonctions biologiques de NF- κ B.....	63

I.2.6. NF- κ B et lymphomagenèse B.....	64
I.2.6.1. NF- κ B et lymphomes agressifs.....	65
I.2.6.1.1. Lymphomes induits par l'EBV.....	65
I.2.6.1.2. Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) EBV ⁻	69
I.2.6.1.3. Lymphome de Burkitt EBV ⁻	72
I.2.6.2. NF- κ B et lymphomes indolents.....	73
I.2.6.2.1. La maladie de Waldenström.....	73
I.2.6.2.2. Leucémie lymphoïde chronique.....	74
I.2.6.2.3. Lymphomes de la zone marginale : lymphomes de MALT.....	76
I.2.6.2.4. Le lymphome de Hodgkin.....	78
I.2.6.3. NF- κ B et Myélome multiple (MM).....	81
I.2.7. Modèles murins avec dérégulation de NF- κ B : impact sur la lymphomagenèse B.....	83
I.2.7.1. Modèles murins invalidés pour les sous-unités de NF- κ B.....	83
I.2.7.2. Modèles murins de surexpression et de sur-activation des sous-unités NF- κ B.....	85
I.2.7.3. Modèles murins invalidés pour les inhibiteurs de NF- κ B.....	86
I.2.7.3.1. Les inhibiteurs classiques.....	86
I.2.7.3.2. BCL3.....	86
I.2.7.4. Modèles murins de surexpression des inhibiteurs de NF- κ B.....	87
I.2.7.4.1. Les inhibiteurs classiques.....	87
I.2.7.4.2. BCL3.....	88
I.2.7.5. Modèles murins d'invalidation des gènes des sous-unités IKK.....	89
I.2.7.6. Modèles murins d'activation constitutive de la sous-unité IKK β	90
I.2.7.7. Modèles murins de surexpression de NIK.....	91
I.2.7.8. Modèles murins de régulateurs de la voie NF- κ B fréquemment mutés dans les lymphomes B.....	92
I.2.7.8.1. A20.....	92
I.2.7.8.2. MYD88.....	93
I.2.7.8.3. Modèles murins du complexe CBM.....	94
I.2.7.8.3.1. CARD11.....	94
I.2.7.8.3.2. BCL10.....	95
I.2.7.8.3.3. BIRC3/MALT1.....	96
I.2.7.8.4. TRAF3.....	97
I.2.7.8.5. Signal CD40.....	98
I.2.7.9. Conclusions sur les différents modèles murins NF- κ B.....	100
I.3. Objectifs.....	103
Chapitre II. Résultats.....	105
II.1. Article.....	105
II.1.1. Introduction.....	105
II.1.2. Manuscrit.....	107

II.2. Evaluation de l'impact au stade pré-tumoral, d'une activation du TLR9 (ODN CpG) sur l'activation des cellules B et la composition du microenvironnement dans le modèle murin λ c-Myc.....	108
II.2.1. Introduction.	108
II.2.1.1. Les cellules Myéloïdes.	109
II.2.1.1.1. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM : <i>Tumor-associated macrophage</i>).....	109
II.2.1.1.2. Les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN : <i>Tumor-associated neutrophils</i>).	111
II.2.1.1.3. Les MDSC (<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>).	112
II.2.1.1.4. Les cellules dendritiques.	113
II.2.1.2. Les cellules lymphocytaires.	114
II.2.1.2.1. Les lymphocytes T.....	114
II.2.1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs.	115
II.2.1.2.3. Les lymphocytes B régulateurs (Bregs).....	115
II.2.1.2.4. Les cellules Natural Killers.....	115
II.2.1.3. Objectif.	116
II.2.2. Matériels et méthodes.....	116
II.2.2.1. Modèles Murins.	116
II.2.2.2. Stimulation TLR9.	116
II.2.2.3. Isolement des cellules murines et immunomarquages.	116
II.2.3. Résultats.....	117
II.2.3.1. Activation des cellules B après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.	118
II.2.3.2. Evolution des populations myéloïdes (polynucléaires, macrophages et cellules dendritiques) après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.	119
II.2.3.3. Evolution des populations de cellules T (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et T régulateur) et NK après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.	122
II.2.3.4. Bilan des résultats.	126
II.2.4. Discussions, perspectives et conclusions.....	127
Chapitre III. Discussions, perspectives et conclusions.	131
III.1. NF- κ B et c-Myc.....	131
III.2. Les co-signaux de la transformation associée à NF- κ B.....	134
III.3. NF- κ B et le lymphome de Burkitt : place du TLR9.....	136
III.4. Le microenvironnement tumoral.	137
III.5. Conclusions.	139
Références bibliographiques.....	141
Table des illustrations	187

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 : *Apoptotic Protease- Activating Factor 1*

APE1 : *Apurinic/apyrimidic Endonuclease 1*

APOBEC : *Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme Catalytic polypeptide-like*

ARF1 : *ADP Ribosylation Factor 1*

ARN : *Acide Ribonucléique*

ATF : *Activating Transcription Factor*

B

B2M : *β2-microglobuline*

Bad : *Bcl-XL/Bcl-2 Associated Death promotor*

BAFF : *B cell Activating Factor*

BANK1 : *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*

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*

Bid : *BH3 Interacting Domain death agonist*

BIRC : *Baculoviral IAP Repeat Containing*

Bim : *Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*

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

BLNK : *B cell linker protein*

BTK : *Bruton Tyrosine Kinase*

C

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*

CCND : *Cycline*

CD : *Cluster of Differentiation*

CDK : *Cycline Dependent Kinase*

CDR : *Complementarity Determining Region*

C/EBPα : *CCAAT/Enhancer Binding Protein*

CFLAR : *CASP8 and FADD-like Apoptosis Regulator*

c-FLIP : *cellular FLICE-like inhibitory protein*

CFSE : *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

CG : *centre germinatif*

c-IAP : *c-Inhibitors of Apoptosis 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*

CPA : *cellule présentatrice d'antigène*

CTAR : *Carboxy-Terminal Activation Region*

CTCF : *CCCTC-binding Factor*

CUL-1 : *Cullin 1*

CYLD : *Cylindromatosis*

D

DLBCL : *Diffuse Large B Cell Lymphoma*

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*

FoxO : *Forkhead box O protein*

FR : *Family of Repeats*

G

Gadd45 : *Growth arrest and DNAdamage inducible 45*

GCB : *Germinal Center B-cell like synthesis*

GCN5 : *General Control of amino-acid synthesis 5*

Gp : *glycoprotéine*

GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

H

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*

ID3 : *Inhibitor Of DNA Binding 3*

IFN : *Interférons*

IGF-1 : *Insulin Growth Factor*

I κ B : *Inhibitor of κ B*

IKK : *I κ B Kinase*

IL : *Interleukine*

IP3 : *inositol triphosphate*

IRAK : *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*

IRE : *initial regulatory element*

IRF : *Interferon Regulatory Factor*



IRP1 : *Iron Regulatory Protein 1*

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif*

J

JAK2 : *Janus Kinase 2*

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

K

Kb : kilobase

kDa : kiloDaltons

L

LB : *Lymphome de Burkitt*

LCR : *Locus Region Control*

LFA-1 : *lymphocyte function-associated antigen-1*

LFA-3 : *lymphocyte function-associated antigen-3*

LLC : *Leucémie Lymphoïde Chronique*

LMP : *Latent Membrane Protein*

LNH : *Lymphome non-Hodgkinien*

LPS : *Lipopolysaccharide*

LTC : *lymphocyte T cytotoxique*

LTβ : *Lymphotoxine β*

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*

MDSC : *Myeloid-derived suppressor cells*

MINE : *c-Myc INSulator Element*

Miz-1 : *Myc Interacting Zinc finger protein 1*

MM : *myélome multiple*

MMP : *MétalloProtéinase Matricielle*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

MYD88 : *Myeloid Differentiation Primary Response 88*

N

NEDD4 : *Neural precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated gene 4*

NEMO : *NF-κB Essential Modulator*

NFAT : *Nuclear Factor of Activated T Cell*

NF-κB : *Nuclear Factor κB*

NGS : *Nouvelle Génération de Séquençage*

NIK : *NF-κB 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*

PD-1 : *Program cell death 1*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PDL-1 : *PD-1 ligand*

PE : *Phycoérythrine*

PerCP : *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3 Kinase*

PIP3 : *Phosphatidylinositol-3;4;5-triphosphate*

PKC : *Protéine Kinase C*

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*

PTPN6 : *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6*

PTPN11 : *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*

PTLD : *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder*

PU1 : *Purine box factor 1*

PUMA : *p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*

R

RANKL : *Receptor Activator of Nuclear Factor - κ B Ligand*

Rag : *Recombination Activating Gene*

RBP-J κ : *Recombination-Binding Protein Jkappa*

RHD : *Rel Homology Domain*

RIP : *Receptor Interacting serine/thréonine Protein*

RIPA : *Radio ImmunoPrecipitation Assay*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

RSS : *Recombination Signal Sequence*

rtTA : *reverse tetracycline dependent Transactivator*

S

SCFFbw7 : *Skp1–Cullin-1–F-box complex that contains FBW7*

SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*

SFK : *Src Family Kinase*

Shh : *Sonic hedgehog*

SHP-1 : *src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*

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-β Activated Kinase 1*

TCF3 : *Transcription Factor 3*

TdT : *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*

TFIIIB : *Transcription Factor III B*

TGFβ : *Transforming Growth Factor β*

TIP : *TAT-Interactive Protein*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNFAIP3 : *TNF Alpha Induced Protein 3*

TLR : *Toll Like Receptor*

Tp53 : *Tumor Protein P53*

TR : *Terminal Repeat*

TRADD : *TNF Receptor-Associated Death Domain*

TRAF : *TNFR-Associated Factor*

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

TRIF : *Toll-Like Receptor Adaptor Molecule*

TRRAP : *Transactivation/transcription domain Associated Protein*

U

URE : *upstream regulatory element*

USP7 : *Ubiquitin Specificprocessing Protease 7*

V

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

ZnF : *Zinc Finger*



Avant-propos

Mon travail de thèse a consisté en l'étude d'une coopération entre deux voies oncogéniques dans les lymphomes B agressifs tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules de type activé (ABC-DLBCL) : NF- κ B et c-Myc.

Mon document comprendra trois chapitres. Le premier chapitre est une introduction bibliographique. Dans un premier temps, nous décrivons le facteur de transcription c-Myc en nous attachant sur la structure du gène, sa régulation et ses fonctions. Ensuite, nous remettons c-Myc dans le contexte de divers lymphomes B agressifs et indolents, ainsi que dans le myélome multiple. Pour finir cette partie traitant de c-Myc, nous ferons une large revue des différents modèles murins présentant une surexpression de c-Myc dans les cellules B. Dans un deuxième temps, sur le même principe que la partie traitant de c-Myc, nous décrivons le facteur de transcription NF- κ B. Et pour finir cette introduction bibliographique, nous définirons les objectifs de la thèse.

La deuxième partie consistera en la description des différents résultats expérimentaux obtenus durant ma thèse. Un premier volet sera consacré à la dérégulation de c-Myc dans un contexte d'activation constitutive de NF- κ B *via* différents inducteurs (virus d'Epstein-Barr, le TLR9 (*toll-like receptor 9*) et un signal CD40 dans divers modèles (*in vitro* et *in vivo*) (Arnaud et al., 2017). La dernière partie présentera des résultats préliminaires sur l'effet de la stimulation du TLR9 sur le microenvironnement des cellules B dans un modèle murin présentant une surexpression de c-Myc dans les cellules B.

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

I.1. Le facteur de transcription c-Myc.

En 1982, le gène codant l'oncoprotéine c-Myc a pour la première fois été décrit comme un analogue de l'oncogène *v-myc* du virus de la myélocytomatose aviaire MC29 (Vennstrom et al., 1982). La même année, il a été démontré que, dans le lymphome de Burkitt, le gène *c-myc*, situé normalement sur le bras court « q » (8q24) du chromosome 8, est juxtaposé avec le locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IGH), situé sur le chromosome 14, provoquant ainsi sa surexpression (Taub et al., 1982). C-Myc peut également être surexprimé par juxtaposition avec les locus des chaînes légères d'immunoglobuline par les translocations t(2;8)(p11;q24) ou t(8;22)(q24;q11). Le lymphome de Burkitt est une tumeur hautement proliférative, ces modifications représentent un événement primaire, c'est-à-dire un événement à l'origine de la pathologie (pour revue: Klapproth and Wirth, 2010). *C-myc* est un puissant oncogène et sa dérégulation, quel qu'en soit le mécanisme, est associée à un comportement clinique extrêmement agressif (Meyer and Penn, 2008; Ott et al., 2013). Cependant, la translocation t(8; 14)(q24; q32) a également été trouvée à fréquence très basse dans le sang et la moelle osseuse d'individus apparemment en bonne santé (Cai et al., 2015), ce qui suggère que les altérations de *c-myc* seules ne sont pas suffisantes pour déclencher la lymphomagenèse.

I.1.1. Organisation du gène *c-myc*.

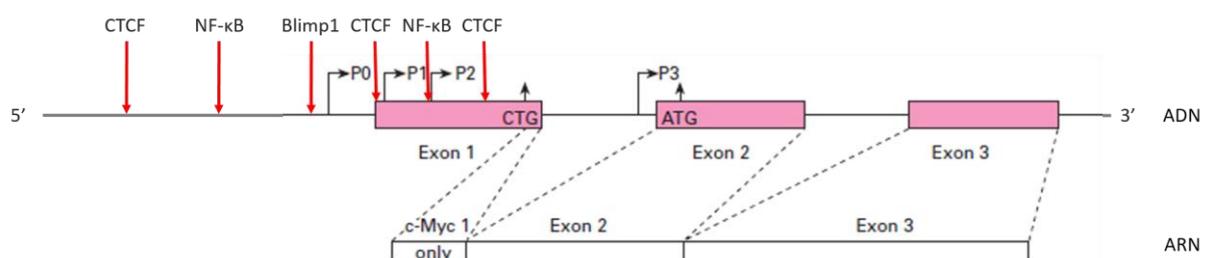


Figure 1 : Représentation schématique du gène *c-myc* (modifié d'après (Ryan and Birnie, 1996)). Les promoteurs P0, P1, P2 et P3 sont signalés par des flèches noires coudées. Les flèches rouges représentent les sites de fixation de certains facteurs de transcription.

Le gène *c-myc* est situé sur le chromosome 8 chez l'Homme, et est constitué de trois exons, l'exon I non codant et les exons II et III codant la protéine c-Myc. Ce gène est régulé par quatre promoteurs, P0, P1, P2 et P3. Comme montré sur le **Figure 1**, P0 est situé dans la région 5' non traduite (5'UTR) du gène, P1 et P2 dans l'exon I et P3 dans l'intron I. Les promoteurs P1

et P2 sont les points d'initiation majoritaires des transcrits du gène *c-myc*, avec une répartition de 75% à 90% pour P2 et 10 à 25% pour P1. Moins de 5% des transcrits sont initiés à partir des promoteurs P0 et P3 (Facchini and Penn, 1998; Ryan and Birnie, 1996; Wierstra and Alves, 2008).

Le gène *c-myc* possède deux sites de liaison à NF-κB :

- URE (*upstream regulatory element*) en amont du promoteur P1
- IRE (*internal regulatory element*) dans l'exon 1.

NF-κB régule *c-myc* après avoir été stimulé par diverses voies de signalisation, telles que par IL-1 (Duyao et al., 1992a), TNF (*Tumor necrosis factor*) (Kirillova et al., 1999) ou encore par le CD40 (Schauer et al., 1996).

D'autres facteurs de transcription se lient au promoteur de *c-myc*, tel que BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) et CTCF (*CCCTC-binding factor*). BLIMP1 réprime le promoteur de *c-myc* causant l'apoptose des cellules. Il se fixe sur le promoteur et recrute des HDAC (histone désacétylase). Les HDAC désacétylent les histones H3 associées au promoteur de *c-myc* et cela permet la répression du gène (*cf* I.1.3) (Lin et al., 1997; Yu et al., 2000). CTCF (*cf* I.1.3) réprime également *c-myc* en se fixant aux différents sites présents sur le promoteur. Cette répression diminue la croissance cellulaire (Filippova et al., 1996).

Il existe un lien étroit entre l'expression de c-Myc et le potentiel prolifératif des cellules, Kelly et al. ont établi un lien direct entre une stimulation mitogénique des cellules quiescentes et une rapide induction de l'ARNm de c-Myc (Kelly et al., 1983).

I.1.2. C-Myc : rôle de facteur de transcription.

C-Myc active divers groupes de gènes grâce à son association en hétérodimère avec la protéine Max (*Myc Associated factor X*). Le domaine basique hélice-boucle-hélice Zipper (bHLHZ) de c-Myc s'associe à Max, qui possède également un domaine bHLHZ (Blackwood and Eisenman, 1991). Cet hétérodimère reconnaît et se fixe sur une séquence d'ADN spécifique, E-Box, possédant CACGTG (Blackwell et al., 1990).



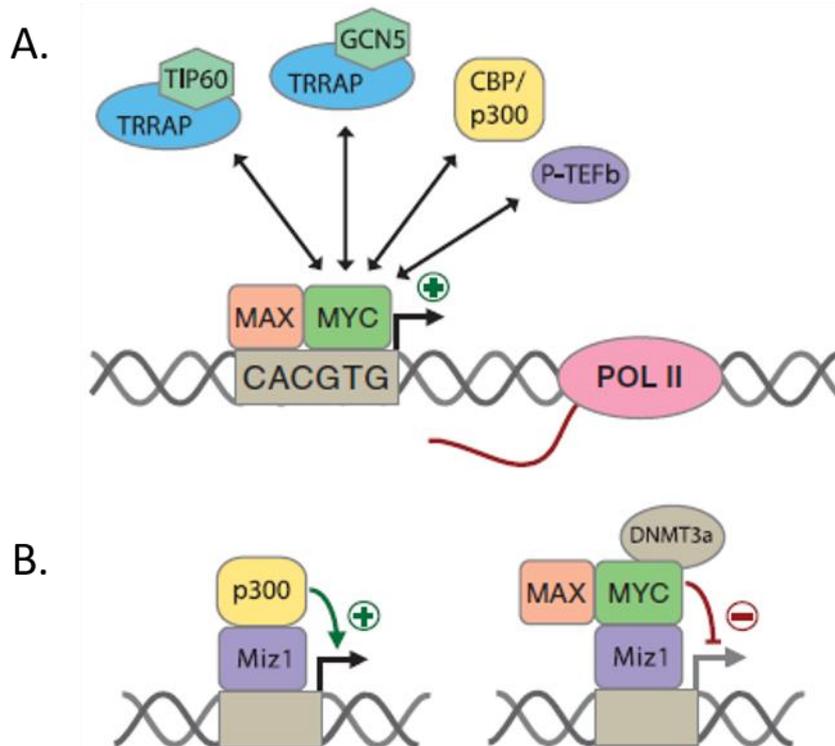


Figure 2 : Activités activatrice et inhibitrice de c-Myc. (modifié à partir de (Klapproth and Wirth, 2010)).
 A. C-Myc recrute des histones acétyltransférases pour remodeler la chromatine : c-Myc interagit directement avec p300, et TIP60 (TAT-interactive protein 60) et GCN5 (General Control of amino-acid synthesis 5) via TRRAP (Transformation/Transcription domain Associated Protein). La liaison de facteurs d'élongation de la transcription tels que P-TEFb (Positive-Transcription Elongation Factor b) est un autre mécanisme d'induction de la transcription des gènes cibles.
 B. Répression transcriptionnelle par le complexe c-Myc/Max (Myc-Associated factor X). Le complexe c-Myc/Max interagit avec MIZ-1 (Myc-Interacting Zinc finger protein 1), l'empêchant de se lier à p300. L'association de c-Myc/Max/MIZ-1 conduit au recrutement d'une ADN méthyltransférase (DNMT3a) induisant la répression de la transcription.

C-Myc peut être un activateur ou un répresseur de la transcription (**Figure 2**). C-Myc est considérée comme un activateur de la transcription qui agit principalement grâce à la modulation de la structure de la chromatine. Les hétérodimères c-Myc/Max modulent la transcription par le recrutement de co-activateurs spécifiques des complexes. C-Myc augmente l'activité transcriptionnelle de gènes cibles par le recrutement d'histones acétyltransférases qui induisent un remodelage chromatidien. C-Myc interagit directement avec l'acétyltransférase p300 (CBP : CREB Binding Protein), tandis que la liaison avec TIP60 (TAT-Interactive Protein) ou GCN5 (General Control of amino-acid synthesis 5) nécessite la présence de TRRAP (Transformation/Transcription Domain-Associated Protein). c-Myc peut recruter d'autres facteurs pour réguler l'expression des gènes, comme P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor) qui phosphoryle le domaine carboxy-terminal de l'ARN

polymérase II (Gargano et al., 2007; Kanazawa et al., 2003), ou l'ubiquitine ligase SKP2 (*S-phase Kinase-associated Protein 2*). L'ubiquitine ligase SKP2 permet de stabiliser c-Myc et joue le rôle de co-activateur transcriptionnel (Kim et al., 2003).

Il existe plusieurs mécanismes de répression transcriptionnelle impliquant c-Myc. C-Myc peut interagir avec les éléments initiateurs de la région promotrice des gènes cibles pour inhiber la transcription (Li et al., 1994). C-Myc peut également interagir avec des facteurs de transcription, comme par exemple MIZ-1 (*Myc Interacting Zinc finger protein*). Les hétérodimères c-Myc/Max empêchent l'interaction entre MIZ-1 et p300, et permet le recrutement d'un co-répresseur, DNMT3a (*DNA Demethyl transferase 3a*) ce qui a pour effet d'éteindre les promoteurs cibles de MIZ-1 (Brenner et al., 2005).

I.1.3. Régulation transcriptionnelle de l'expression de c-Myc

La régulation des promoteurs de *c-myc* est régie par de nombreuses voies de signalisation :

- Cytokines IL-1, IL-6, IFN- γ (Interferon gamma) TNF (*Tumor Necrosis Factor*), et TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*)
- Facteurs de croissance comme EGF (*Epidermal Growth Factor*) et PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)
- Hormones : œstrogènes, hormones thyroïdiennes, EPO (érythropoïétine)

Ces voies de signalisation induisent des facteurs de transcription qui viennent se fixer sur les promoteurs de *c-myc* pour réguler négativement ou positivement sa transcription. Les facteurs Smad, C/EBP α (*CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha*), BLIMP1 (*B lymphocyte induced maturation protein 1*), p53 régulent négativement l'expression de *c-myc* alors que les protéines STAT3, FBP (*Fuse Binding Protein*) ou E2F sont des régulateurs positifs. On retrouve également des protéines de la famille NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) possédant à la fois un effet positif et négatif en fonction des sous-unités impliquées, les dimères RelB/p52, RelA/p50 ou la surexpression de RelA activent le promoteur de *c-myc*, tandis que l'homodimère p50/p50 ou la surexpression de p50 le réprime (pour revue : (Wierstra and Alves, 2008)).



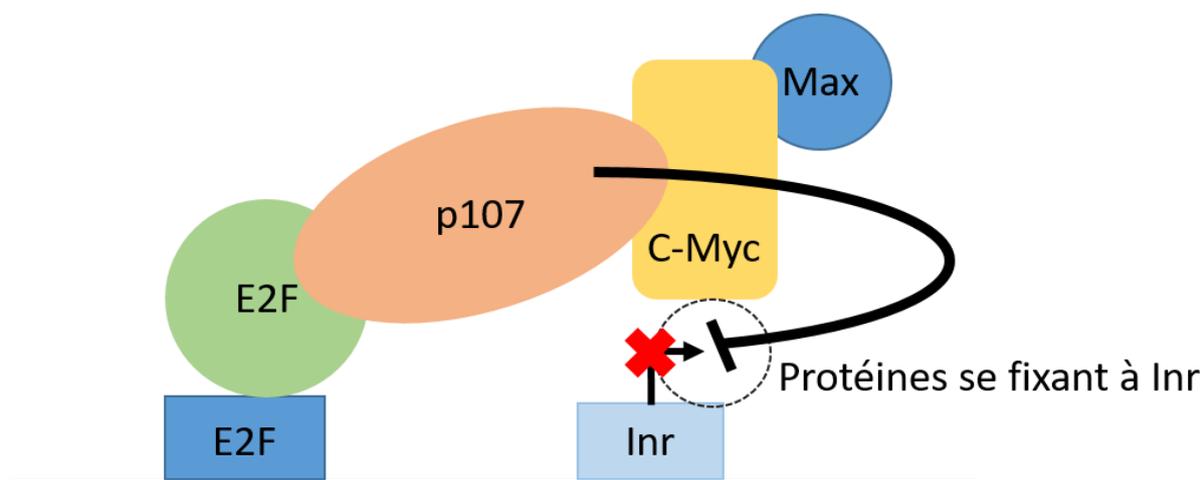


Figure 3 : Représentation du mécanisme d'auto-répression du promoteur P2 de *c-Myc*. L'auto-répression de *c-Myc* comprend la liaison de *c-Myc/Max* à l'*Inr*, la liaison d'*E2F* au site *E2F* et l'interaction de *p107* à la fois avec *c-Myc* et *E2F*.

La protéine *c-Myc* réprime son propre promoteur de manière dépendante de sa concentration au niveau de l'initiation de la transcription (Cleveland et al., 1988). *C-Myc* réprime principalement le promoteur P2 par un mécanisme impliquant les éléments *Inr* (*initiator element*) et le site de liaison aux protéines de la famille *E2F* (Facchini et al., 1997). La répression est complètement perdue si le site *E2F* et les *Inr* sont mutés. Étant donné que l'auto-répression de *c-myc* est perdue dans les cellules mutées pour *p107* (protéine similaire à la protéine du rétinoblastome *pRb*), *p107* est donc essentielle pour l'auto-répression de *c-Myc*. Alors que *p107* se lie à la fois à *c-Myc* et *E2F*, il est suggéré que l'auto-répression de *c-Myc* comprend la liaison de *c-Myc/Max* à l'*Inr*, la liaison d'*E2F* au site *E2F* et l'interaction de *p107* à la fois avec *c-Myc* et *E2F* (Luo et al., 2004) (**Figure 3**). Cette régulation négative de *c-myc* représente un mécanisme global de contrôle homéostatique, qui semble être critique pour le contrôle normal de la croissance cellulaire en tant que «soupape de sécurité». Cette perte d'auto-régulation est un mécanisme qui contribue à l'activation oncogénique de *c-myc* (Grignani et al., 1990).

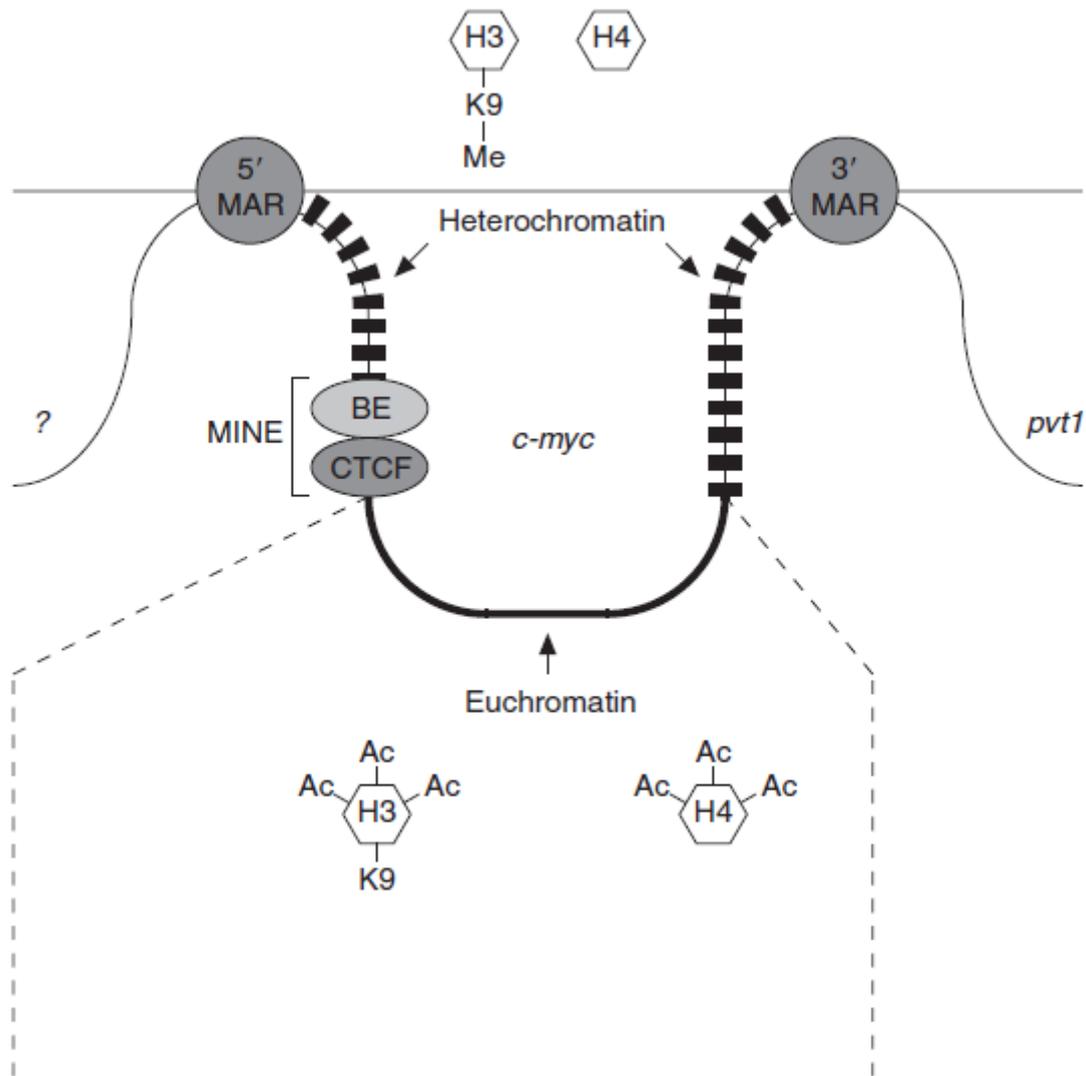


Figure 4 : Représentation schématique du gène *c-myc* (modifié à partir de (Wierstra and Alves, 2008)). MINE : *c-myc inhibitor element*, BE : *Barrier Element*, CTCF : *CCCTC-binding factor*.

La structure du gène de *c-myc* permet aussi sa régulation. En effet les MARs (*Matrix attachment regions*) sont des séquences d'ADN permettant l'ancrage de la chromatine à la matrice nucléaire, et permettant l'isolement du locus de *c-myc* des régions voisines. Les MARs, situées à 50 kb en 5' et 80 kb en 3' du locus de *c-myc*, forment une boucle. Cette boucle permet de décompacter l'ADN et facilite l'association des régions promotrices avec des facteurs de transcription. L'euchromatine transcriptionnellement active, caractérisée par l'hyperacétylation des histones H3 et H4 et la non méthylation de la lysine (K9) de l'histone H3, s'étend sur 7 à 7,5 kb et comprend la région promotrice de *c-myc* et les séquences transcrites. Cette euchromatine est flanquée par l'hétérochromatine transcriptionnellement inerte, contenant les histones H3 et H4 hypoacétylées et l'histone H3-K9-méthylée (Gombert et al., 2003). De façon générale, l'hypoacétylation diminue l'expression du gène *c-myc* et

l'hyperacétylation augmente son expression (Jenuwein and Allis, 2001). Dans la région en amont, l'euchromatine et l'hétérochromatine sont séparées par une région située à 2,5 kb en 5' du site d'initiation de la transcription de *c-myc*, le MINE (*c-myc inhibitor element*). Le MINE fonctionne comme un isolant et est composé d'un élément de barrière (BE) et d'un site de liaison à CTCF (Gombert et al., 2003). Le MINE présente une activité de blocage des séquences amplificatrices du gène (*enhancers*) ainsi qu'une activité de barrière qui permet le recrutement de HDAC (Dhillon and Kamakaka, 2002). L'activité de blocage des amplificateurs est médiée par CTCF qui est suffisante pour bloquer l'amplificateur (Bell et al., 1999).

Le profil de méthylation du gène *c-myc* peut également influencer son expression. En effet, la perte de l'expression de c-Myc par hyperméthylation médie la différenciation trouvée dans les cellules K562 traitées par ara-C (cytarabine : analogue nucléosidique de la pyrimidine utilisé comme anticancéreux, il bloque la synthèse d'ADN) (Baker et al., 1994). À l'inverse, une hypométhylation induit une surexpression du gène *c-myc* dans les carcinomes hépatocellulaires et gastriques et joue un rôle dans la transformation maligne des cellules (Tsujiuchi et al., 1999). Il a été aussi montré qu'une hypométhylation de l'exon 3 de *c-myc* induit une surexpression de c-Myc dans des lignées cellulaires humaines de myélome. Ce profil de méthylation n'est pas retrouvé dans les lignées B normales ou de lymphome de Burkitt (Ohtsuki et al., 1991). De plus, une autre étude portant également sur le profil de méthylation de l'exon 3 de *c-myc* a montré que l'hypométhylation est peu fréquente dans les tumeurs à cellules B. Sur les 27 patients étudiés avec soit une leucémie lymphoïde chronique (LLC) ou une leucémie polymphocytaire, 4 seulement présentent une hypométhylation sur l'exon 3. L'hypométhylation de l'exon 3 de *c-myc* peut être impliqué dans le développement de certains cas de tumeurs malignes à cellules B (Crossen and Morrison, 1999). De façon générale, l'hyperméthylation diminue l'expression du gène *c-myc* et l'hypométhylation augmente son expression (pour revue : (Wierstra and Alves, 2008)).

I.1.4. Régulation post traductionnelle de c-Myc.

La régulation de l'activité de la protéine c-Myc implique plusieurs mécanismes tels que la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation ou encore l'ubiquitination.

C-Myc peut être phosphorylé sur une douzaine de sérines et thréonines : T58, S62, S71, S82, S164 en N-terminale, sur 5 résidus entre les résidus 240 et 262, et sur les S293, T343, S344, S347 et S348 en C-terminale. Parmi ces sites, T58 et S62 semblent être les plus

fonctionnellement pertinents. Sur la base des études de plusieurs groupes, les stimuli prolifératifs activent des kinases spécifiques pour phosphoryler S62 et ainsi augmenter la stabilité de c-Myc. Phospho-S62 peut alors servir de plate-forme pour la phosphorylation de T58 par GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*). Cette phosphorylation induit le recrutement de Pin1 (*peptidyl-prolyl cis/trans isomerase*) qui induit un changement de conformation et permet l'accessibilité de la S62 à la PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) pour déphosphoryler S62. Ce qui permet au suppresseur de tumeur FBW7 (*F-box and WD repeat domain-containing 7*) de se lier puis recruter le complexe SCF^{FBW7} (*Skp1–Cullin-1–F-box complex that contains FBW7*) pour permettre l'ubiquitination de c-Myc et la dégradation par le protéasome. Le résidu T58 doit être phosphorylé pour que l'ubiquitination de c-Myc par le facteur FBW7 se fasse. (Arnold and Sears, 2008; Meyer and Penn, 2008; Welcker and Clurman, 2008; Yeh et al., 2004). Il est à noter que deux autres ubiquitines ligases régulent la dégradation de c-Myc : Skp2 et Hect H9 (Adhikary et al., 2005; Kim et al., 2003).

La protéine c-Myc peut également être O-glycosylée sur le résidu T58 dans le domaine TAD. Cette glycosylation augmente l'activité de c-Myc et est associée à une augmentation de l'activité transformante et de la tumorigénicité (Chou et al., 1995). Des mutations sur la position T58 de c-Myc sont fréquemment retrouvées dans les lymphomes de Burkitt (Albert et al., 1994; Chou et al., 1995).

Pour finir, la protéine c-Myc est acétylée sur de multiples résidus lysine par les cofacteurs transcriptionnels/acétyltransférases, p300/CBP, GCN5 (*General Control of amino-acid synthesis 5*) et TIP60 (*TAT-interactive protein 60*) (Faiola et al., 2005). L'acétylation des lysines (K143, K157, K275, K317, K323 et K371) de c-Myc médiée par p300 est associée à une augmentation du renouvellement et de la dégradation de la protéine c-Myc. Ceci contraste avec le rôle de l'acétylation par GCN5 et TIP60, qui s'est avéré stabiliser et augmenter significativement la demi-vie de c-Myc (Faiola et al., 2005; Patel et al., 2004). Il est important de noter que, puisque de nombreux sites d'acétylation dans c-Myc ont été identifiés par des études biochimiques *in vitro*, le rôle des acétylations dans les fonctions biologiques de c-Myc reste à déterminer complètement.



I.1.5. Rôles et cibles de c-Myc dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.

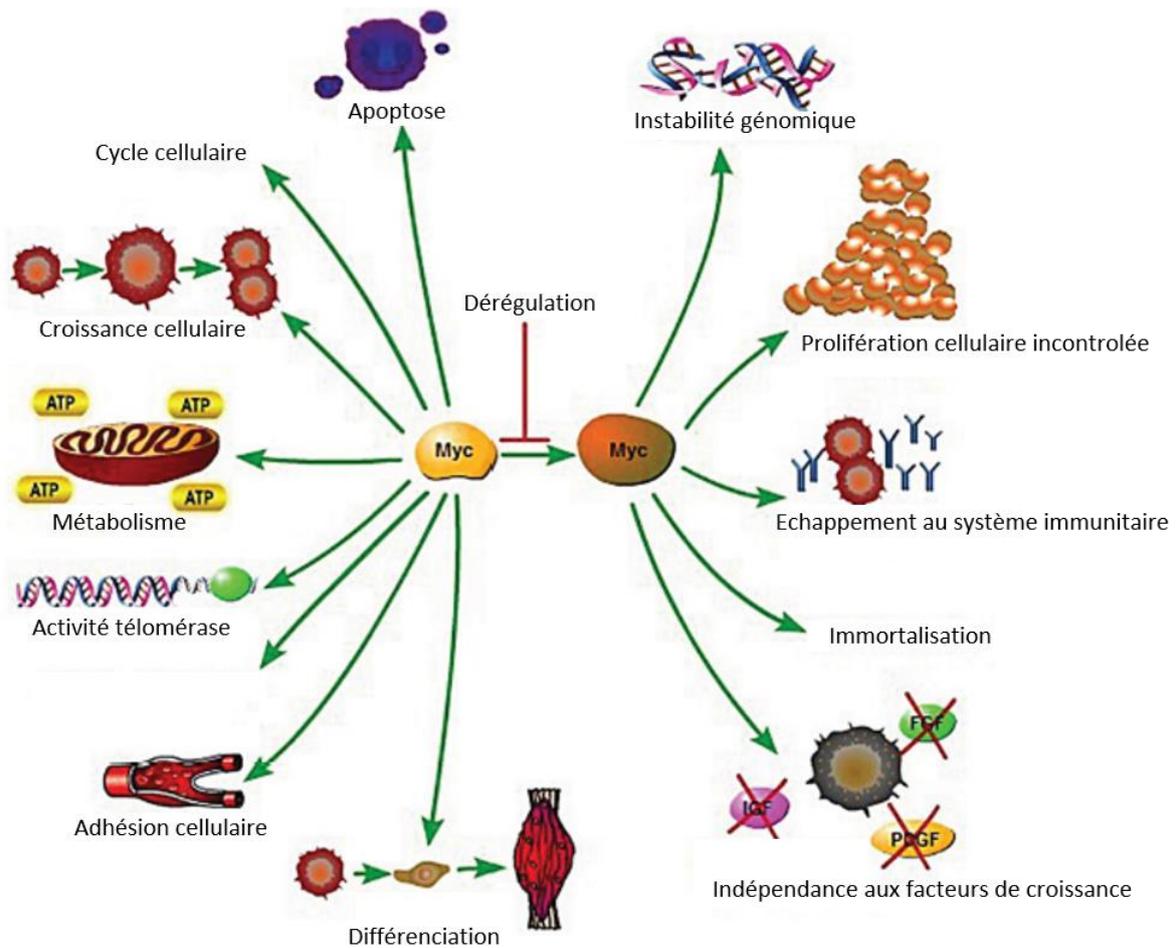


Figure 5 : Processus cellulaires contrôlés par c-Myc dans des conditions normales et lors de la tumorigénèse (Cai et al., 2015).

Des dérégulations de l'expression de c-Myc ont été reportés dans nombres de cancers humains, parmi ceux-ci on retrouve le cancer du côlon, du sein, du col de l'utérus, carcinome pulmonaire à petites cellules, ostéosarcome, mélanome ou encore leucémie myéloïde (Pelengaris et al., 2002). C-Myc est le facteur maître de la prolifération cellulaire, et peut être impliqué dans de nombreuses autres fonctions biologiques telles que la croissance cellulaire, l'apoptose, ou encore l'angiogenèse (Vita and Henriksson, 2006).

I.1.5.1. C-Myc et prolifération cellulaire / croissance cellulaire.

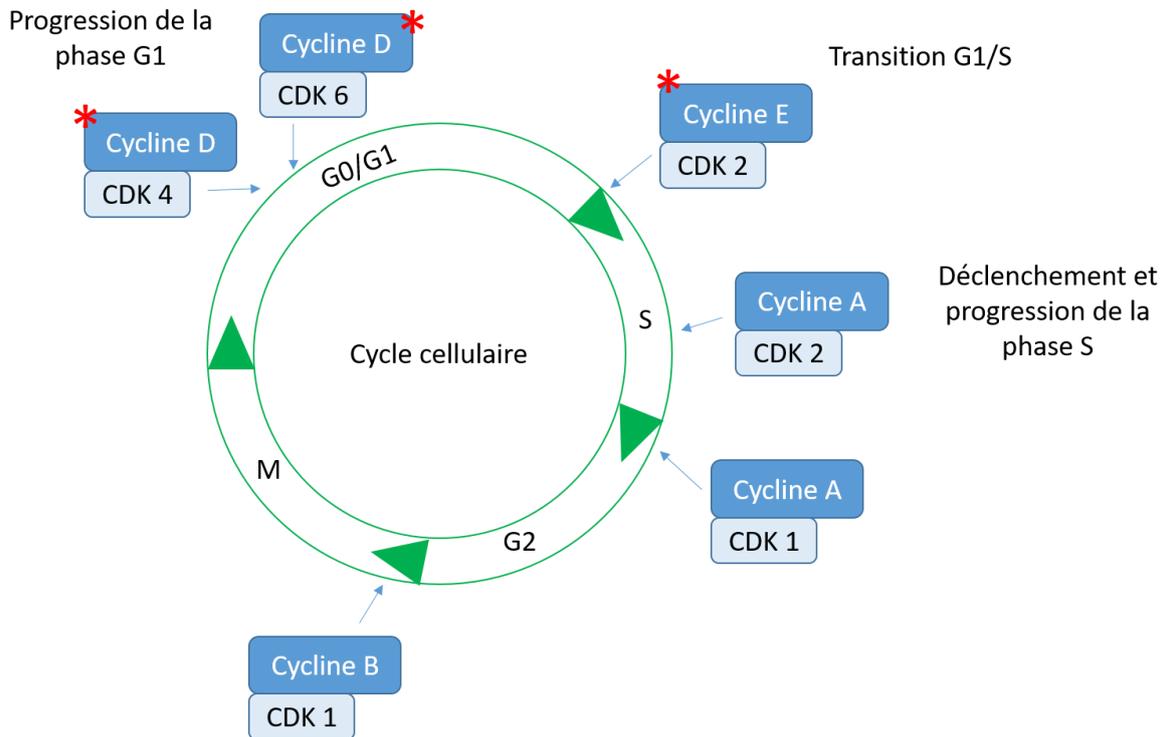


Figure 6 : Les différentes phases du cycle cellulaire sont contrôlées par des complexes protéiques associant une kinase CDK à une sous-unité régulatrice (cycline). Ces complexes cycline-CDK régissent le passage des différents points de contrôle et la progression dans le cycle. Les étoiles rouges représentent les points d'action de c-Myc (pour plus de précision cf **figure 7**).

C-Myc est étroitement lié à la prolifération cellulaire. Les différentes étapes du cycle cellulaire sont résumées dans la **Figure 6**. La progression de la phase G0/G1 vers la phase S est contrôlée par l'activité des complexes CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) : cycline D-CDK4 et cycline E-CDK2. C-Myc induit l'expression de la cycline D2 et de CDK4. Ces deux protéines séquestrent p27^{KIP1}, un inhibiteur de CDK, dans le complexe cycline D2-CDK4. CUL1 (Cullin 1) et CKS (*Cyclin-dependent Kinases regulatory Subunit*), deux gènes cibles de c-Myc sont également impliqués dans la dégradation de p27^{KIP1}. L'augmentation de l'activité des complexes cyclines/CDK2 et CDK4 permet l'hyperphosphorylation de pRb (protéine du rétinoblastome) et ainsi provoque la libération d'E2F. Il existe plusieurs versions de pRb : pRb, p130, et p107 qui séquestrent différents facteurs de transcription E2F (E2F1, 2, 3, 4, 5). E2F permet la transcription du gène de la cycline E. De plus, c-Myc contrôle l'expression des gènes codant E2F1 et E2F2 (Sears et al., 1997). Le complexe cycline E-CDK2, n'étant plus inhibé par p27^{KIP1}, permet le passage à la phase S. De plus, les inhibiteurs de CDK, p15^{INK4B} et p21^{WAF1}, sont

inactivés par l'interaction entre l'hétérodimère c-Myc/Max et MIZ1 (Pelengaris et al., 2002) (Figure 7).

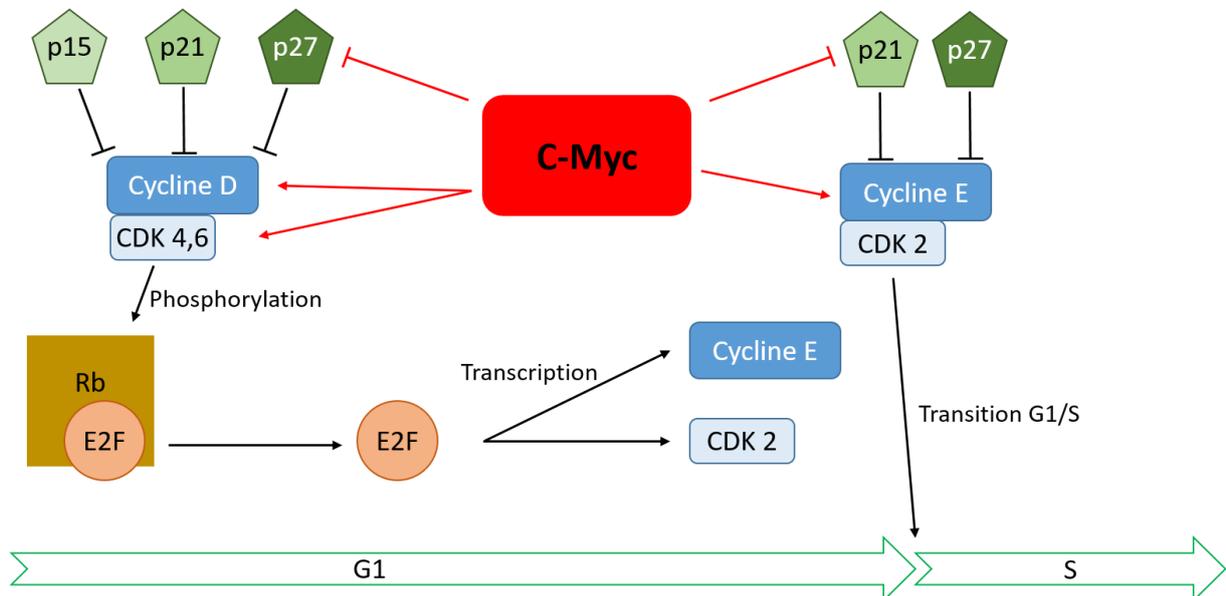
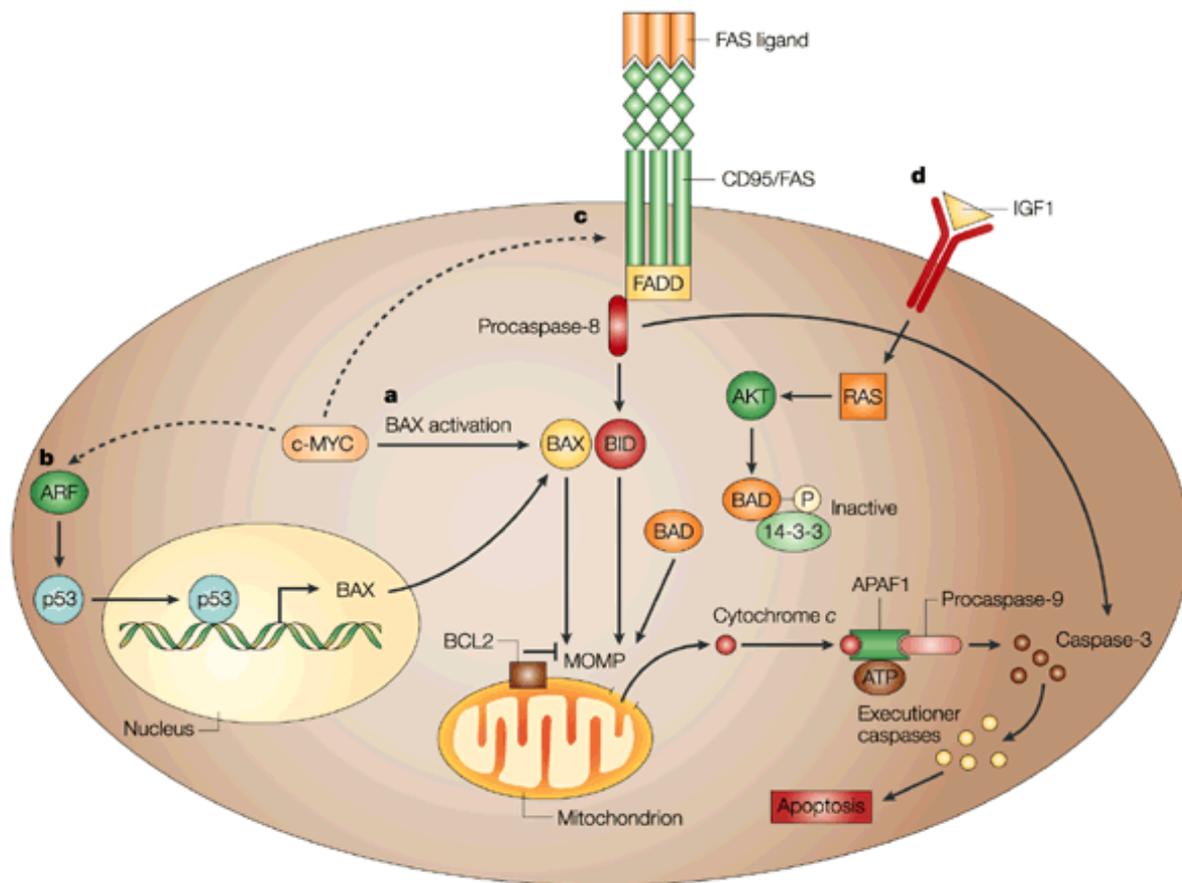


Figure 7 : Représentation schématique du contrôle de la progression en G1 et du passage en G1/S par c-Myc. C-Myc permet la transcription du gène de la cycline D qui permet la phosphorylation de pRb aboutissant à la libération du facteur de transcription E2F. E2F permet l'expression de la cycline E et de CDK2. C-Myc réprime l'activité des inhibiteurs des CDK et favorise la dégradation de p27 par le protéasome.

La protéine c-Myc a aussi la capacité d'influencer la croissance cellulaire. La croissance cellulaire est définie par l'augmentation de la taille et de la masse de la cellule (Beier et al., 2000). En effet, c-Myc est capable d'augmenter l'expression d'eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4 E*) et eIF2 α (*eukaryotic Initiation Factor 2 α*), qui sont impliqués dans la régulation de la traduction des ARN. La protéine eIF4E est impliquée dans la coiffe en 5' de l'ARNm et eIF2 α fait partie du complexe eIF2 responsable de la fixation de l'ARNt initiateur portant la méthionine (Rosenwald et al., 1993). C-Myc peut aussi réguler la transcription des ARN polymérase I, permettant la synthèse des ARN ribosomiaux, et III responsable de la synthèse d'ARN courts comme l'ARN de transfert. C-Myc se lie au facteur de transcription TFIIIB (*Transcription Factor for polymerase III B*), spécifique de l'ARN polIII (Gomez-Roman et al., 2003). Ainsi, par ces mécanismes, il a été montré dans le modèle murin E μ -myc que les cellules B présentent une augmentation à la fois de la synthèse protéique et une augmentation de leur taille à tous les stades de leur développement (Iritani and Eisenman, 1999).

I.1.5.2. C-Myc et apoptose.



Nature Reviews | Cancer

Figure 8 : Interaction de c-Myc avec les voies de signalisation apoptotiques.

a. L'activation de la protéine Bax (Bcl-2 Associated X protein) par c-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 c-Myc conduit également au relargage du cytochrome c: l'activation directe de p53 par c-Myc via ARF (ADP Ribosylation Factor 1).

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. c-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/Bcl-2 Associated Death promotor) (Pelengaris et al., 2002).

Akt : AK Transforming ; MOMP : Mitochondrial Outer Membran Permeabilization

L'oncoprotéine c-Myc, qui est un inducteur de la prolifération, a aussi une activité pro-apoptotique (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Shi et al., 1992). L'expérience princeps a consisté en l'étude de la privation en IL-3 dans la lignée cellulaire murine 32D dépendante à

IL-3 pour sa croissance. La privation a diminué l'expression de c-Myc et induit l'arrêt du cycle en phase G0/G1 et parfois l'apoptose de ces cellules. L'expression forcée de c-Myc dans ces cellules privées en IL-3 sensibilise et accélère l'apoptose (Askew et al., 1991). Des fibroblastes exprimant constitutivement c-Myc et privés de sérum arrêtent leur croissance cellulaire et subissent l'apoptose induite par l'expression constitutive de c-Myc (Evan et al., 1992). Dans un modèle murin permettant la délétion de *c-myc* grâce à la recombinaise CRE, c-Myc a également un rôle dans la sensibilisation à l'apoptose des lymphocytes B. En effet, les cellules B primaires déficientes pour c-Myc sont résistantes à l'apoptose induite par le CD95 ou par la staurosporine. La résistance à la mort cellulaire induite par CD95 est en corrélation avec des niveaux inférieurs d'expression de surface de CD95 et de CD95L (de Alborán et al., 2004). L'induction de l'apoptose par c-Myc passe par différentes voies : les voies dépendantes ou indépendantes de p53, la voie mitochondriale ou encore les récepteurs de mort tels que CD95 (Hoffman and Liebermann, 2008; Pelengaris et al., 2002) (**Figure 8**).

L'expression de la protéine p53 augmente en réponse au stress. Le niveau de la protéine p53 est contrôlé par la boucle de régulation ARF-Mdm2-p53. Mdm2 (*Murine double minute 2*) est un régulateur négatif de p53, entraînant sa dégradation par le protéasome et ARF1 (*ADP Ribosylation Factor 1*) inhibe Mdm2. C-Myc augmente de façon indirecte le suppresseur de tumeur ARF1 *via* FoxO (*Forkhead box O protein*) (Bouchard et al., 2007). ARF1 inhibe alors Mdm2, et entraîne sa dégradation par le protéasome. P53, étant activé, induit l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Zindy et al., 1998). De plus, la prolifération induite par la surexpression *in vivo* de c-Myc entraîne des dommages à l'ADN, ce qui active la voie ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), voie de régulation de la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN. Cette voie active p53 et promeut l'apoptose (Pusapati et al., 2006).

C-Myc peut également sensibiliser les cellules à l'apoptose mitochondriale en activant les protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bim) ou en réprimant les protéines anti-apoptotiques (Bcl 2, Bcl-XL) (Eischen et al., 2001; Soucie et al., 2001). Le gène de Bax contient dans son promoteur des séquences E-Box sur lesquelles viennent se fixer des hétérodimères c-Myc/Max, entraînant une augmentation de l'expression de Bax (il est à noter que Bax est aussi un gène cible de p53) (Mitchell et al., 2000). Dans des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires et des cellules d'ostéosarcomes stimulées par une drogue cytotoxique, c-Myc coopère avec la caspase 2 dans l'activation de Bax pour l'intégration à la membrane

mitochondriale (Cao et al., 2008). Dans les cellules B, la protéine pro-apoptotique Bim est induite par c-Myc et participe à l'induction de l'apoptose (Egle et al., 2004). C-Myc est également capable d'inhiber l'expression des protéines Bcl2 et Bcl-XL dans un modèle de lymphomagenèse Eμ-Myc. C-Myc diminue également les niveaux d'ARN et de protéine Bcl-XL (Eischen et al., 2001).

L'apoptose induite par c-Myc peut également passer par les récepteurs de mort : DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), CD95/CD95L, TRAIL/TRAIL-Récepteur (*TNF Related Apoptosis-inducing Ligand*). C-Myc agit à plusieurs niveaux :

- Sensibilisation des cellules à l'action de CD95L ou TRAIL (Hoffman and Liebermann, 2008).
- Répression des voies de survie associées aux récepteurs de mort et à l'activation de DISC comme la voie NF-κB qui protège de l'apoptose induite par ces récepteurs (Kleefstrom et al., 1997).
- Modification de la signalisation : c-Myc réprime la transcription de c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) (inhibiteur de la caspase 8) pour induire l'augmentation de l'activation de la caspase 8 (Ricci et al., 2004).

I.1.6. C-Myc et lymphomagenèse B.

L'amplification génique, les translocations, les mutations ponctuelles, les reprogrammations épigénétiques (modifications des marques épigénétiques telles que le profil de méthylation), une meilleure traduction et une augmentation de la stabilité protéique peuvent conduire à une surexpression de l'oncogène *c-myc* et donc à sa dérégulation dans les cancers (Rabbitts et al., 1984; Yeh et al., 2004). La dérégulation de c-Myc peut être trouvée dans 80% des cancers du sein, 70% des cancers du côlon, 90% des cancers gynécologiques, 50% des carcinomes hépatocellulaires, 30% des cancers du poumon et dans un grand nombre de tumeurs hématologiques (Cai et al., 2015).

I.1.6.1. C-Myc et lymphome de Burkitt.

Le lymphome de Burkitt est composé de cellules B matures avec un index de prolifération élevé (>95% (Hummel et al., 2006)), tel que mesuré sur coupe d'immunohistochimie grâce au marqueur de prolifération Ki67. Ces cellules B ont un



immunophénotype de cellule B de centre germinatif. En effet, ces cellules expriment les antigènes spécifiques du lignage B (CD20, CD79a et PAX5) et les antigènes du centre germinatif CD10 et BCL6. D'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le lymphome de Burkitt est subdivisé en trois variants : 1) endémique (eBL) retrouvé en Afrique, Amérique du Sud et en Nouvelle Guinée ; 2) sporadique (sBL) ; 3) et lié à une immunodéficiência (iBL). Dans tous les cas, le réarrangement de *c-myc* au locus des immunoglobulines est obligatoire et l'activation du gène *c-myc* est considérée comme la principale caractéristique pathogénique des lymphomes de Burkitt.

Le variant eBL est fortement associé au virus d'Epstein-Barr (EBV) (>90% des cas). Le sBL est occasionnellement associé à une infection par l'EBV (10 à 20% des cas). L'EBV représente 30% à 50% des cas de iBL (Molyneux et al., 2012). La translocation t(8;14)/*c-myc-IgH* est l'aberration la plus fréquente impliquant le gène *c-myc*. Les translocations les moins courantes mettent en jeu les chaînes légères d'immunoglobulines, t(2;8)/*κ-myc* et t(8;22)/*myc-λ* (Ott et al., 2013) (**Figure 9**). Dans l'eBL, le point de cassure de la translocation se produit habituellement en 5' du gène *c-myc*. Le gène *c-myc* est donc intact. Dans les cellules normales lors de la transcription à partir de P1, l'ARN polymérase II marque une pause au niveau du promoteur P2. Cet arrêt empêche la transcription à partir de P1 (**Figure 10**). On observe un changement de promoteur de P2 à P1, qui serait dû aux régions régulatrices des gènes de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Polack et al., 1993). On a donc une transcription préférentielle à partir de P1 (Strobl and Eick, 1992; Strobl et al., 1993). Dans le sBL, le point de cassure est souvent dans l'exon 1 ou l'intron 1. Les régions codantes des exons 2 et 3 sont toujours intactes. Dans ces cas, les éléments régulateurs des amplificateurs de gène (*enhancers*) de l'immunoglobuline activent la transcription de *c-myc* sans interaction avec les éléments du promoteur de *c-myc*. La transcription est initiée dans le premier intron de *c-myc*. (Pelicci et al., 1986; Shiramizu et al., 1991).



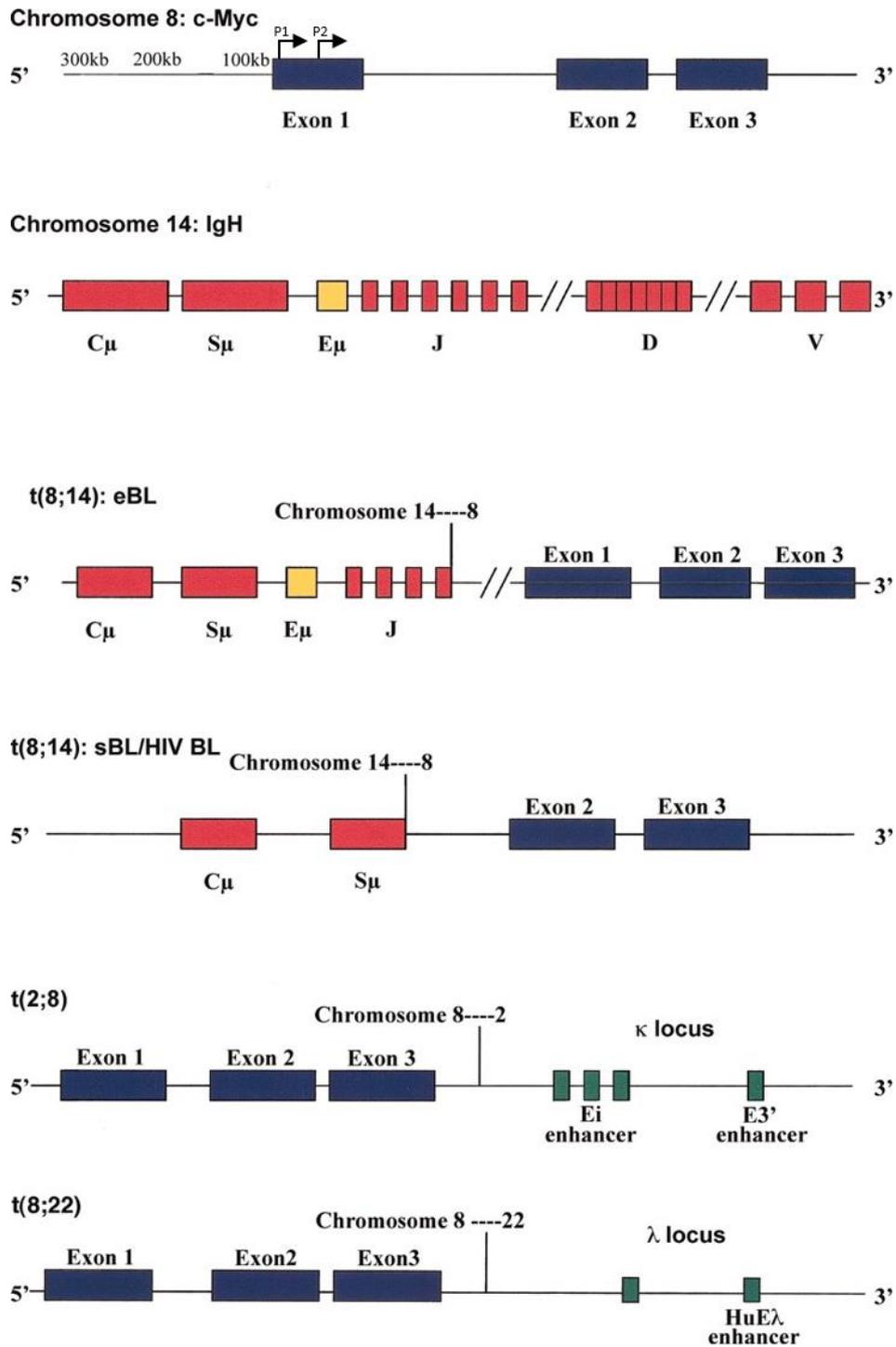


Figure 9 : Localisation des points de cassure au niveau du gène *c-myc* et sur le locus *IgH* lors du lymphome de Burkitt (LB) (modifié à partir de (Blum et al., 2004). Les points de cassure pour $t(8;14)$ dans le LB endémique (eBL), le LB sporadique (sBL) et l'immunodéficience BL (HIV BL) sont représentés. La juxtaposition de l'amplificateur $E\mu$ sur le gène *IgH* du chromosome 14, les amplificateurs Ei et $E3'$ dans le locus κ du chromosome 2 et l'amplificateur $HuE\lambda$ dans le locus λ du chromosome 22 avec le gène *c-myc* sur le chromosome 8 entraînent une surexpression de *c-Myc* dans les LB avec les translocations $t(8;14)$, $t(2;8)$, et $t(8;22)$. Dans les sBL, l'amplificateur $E\mu$ est éliminé lors de la translocation, ce qui indique que d'autres éléments tels que l'amplificateur lointain $E\alpha$ peut être responsable de la transcription *c-myc* (Lieberson et al., 1995).

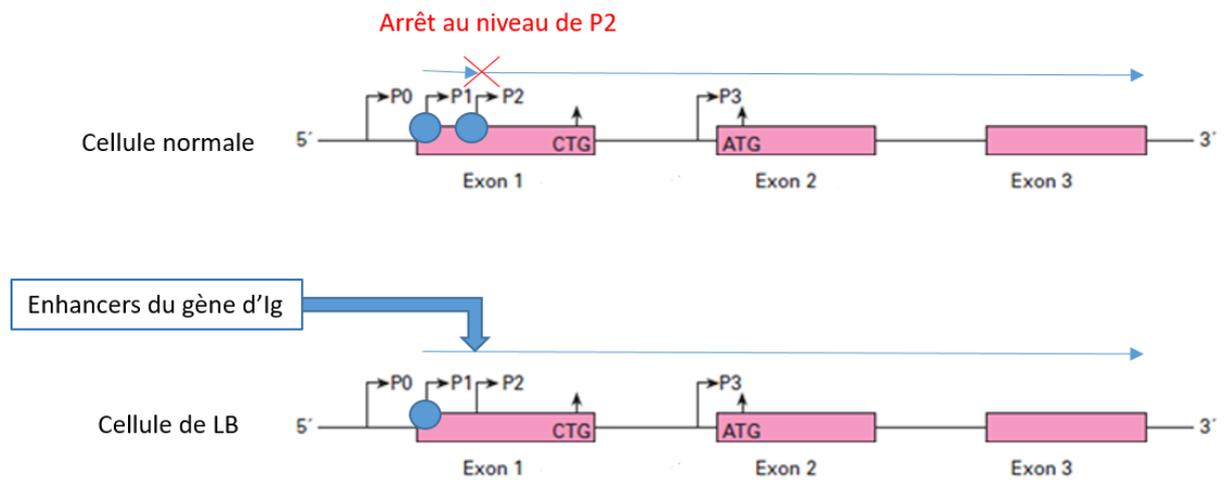


Figure 10 : Représentation schématique du changement de promoteur de P2 vers P1 dans les cellules de lymphomes de Burkitt. (ARN polymérase II : rond bleu)

Des mutations de *c-myc* sont retrouvées dans environ 60% des lymphomes de Burkitt (Bhatia et al., 1993; Giulino-Roth et al., 2012). La plupart de ces mutations ciblent des domaines fonctionnels qui augmentent le potentiel oncogénique de c-Myc. Une stabilité accrue de la protéine ou des modifications de la fonction de transcription sont la conséquence de ces mutations (Arnold and Sears, 2008; Rabbitts et al., 1984; Welcker and Clurman, 2008; Yeh et al., 2004). Des mutants de c-Myc retrouvés dans les lymphomes de Burkitt ont perdu la capacité à induire l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim, tout en conservant son pouvoir prolifératif (Hemann et al., 2005). Dans la plupart des cas de lymphome de Burkitt, ces mutations sont les mutations dans le domaine de transactivation de c-Myc (P57S et T58A) (Chang et al., 2000)

Des mutations génétiques, dites secondaires, touchant d'autres gènes sont également essentielles pour la lymphomagenèse dépendante de c-Myc. Des mutations inactivatrices ou des délétions de *tp53* sont retrouvées dans 40% des cas de lymphome de Burkitt (Dang et al., 2005; Farrell et al., 1991). Les mutations inactivatrices de *tp53* permettent d'inhiber l'induction de l'apoptose induite par c-Myc et contribuent à l'instabilité génomique (Cai et al., 2015; Klapproth and Wirth, 2010). La transcription de la protéine PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) est diminuée dans 40% des lymphomes de Burkitt grâce à un mécanisme de méthylation de l'ADN. Ainsi la lymphomagenèse induite par c-Myc est impulsée (Garrison et al., 2008). La protéine pro-apoptotique Bim est couramment inactivée dans les

lymphomes de Burkitt. Cela peut être due à l'hyperméthylation du promoteur de *bim* (Mestre-Escorihuela et al., 2007).

Des mutations sur la voie de signalisation du BCR (de type IgM) conduisent à un signal tonique dans le lymphome de Burkitt (Corso et al., 2016; Love et al., 2012; Richter et al., 2012; Schmitz et al., 2012). Un signal tonique est un signal identique à un signal consécutif à une activation normale du BCR mais sans la stimulation par un antigène. Le maintien d'un signal tonique du BCR permet de promouvoir la survie des cellules B *via* la voie PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) indépendamment de la stimulation par un antigène (Gauld et al., 2002; Limon and Fruman, 2010). Parmi les mutations sur la voie de signalisation BCR, il est retrouvé des mutations sur la voie TCF3 (*Transcription Factor 3*)/ID3 (*Inhibitor Of DNA Binding 3*). TCF3 est un facteur de transcription exprimé dans les cellules B de la zone sombre du centre germinatif (Victoria et al., 2012). Il permet l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que *ccnd3*, *e2f2*. TCF3 induit également ID3 qui est son inhibiteur, et permet un rétrocontrôle négatif (Seitz et al., 2011). TCF3 favorise l'activation de la PI3K, en transactivant les loci d'immunoglobulines augmentant ainsi l'expression du BCR de surface et en inhibant l'expression de PTPN6 (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6* appelée aussi SHP-1 (*src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*)) qui bloque la signalisation du BCR (Cornall et al., 1998; Schmitz et al., 2012). Les mutations activatrices de TCF3 et inhibitrices de ID3 permettent une activation constitutive de la voie de signalisation du BCR. ID3 est mutée dans 38 à 68% des cas de lymphome de Burkitt tandis que TCF3 dans 11% (Richter et al., 2012). En favorisant la survie des cellules des lymphomes de Burkitt ces mutations constituent un mécanisme de coopération avec c-Myc dans cette pathologie. Ces mutations de TCF3 et ID3 ne sont pas retrouvées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules et sont spécifiques des lymphomes de Burkitt, renforçant l'idée qu'ils sont un mécanisme coopérant avec c-Myc pour développer et maintenir l'identité du Burkitt (Love et al., 2012).

1.1.6.2. C-Myc et lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL : *diffuse large B-cell lymphoma*).

Les lymphomes B diffus à grandes cellules sont les types les plus fréquents de lymphome non hodgkinien, représentant 30% à 40% de tous les cas de lymphomes. Cette maladie survient généralement chez les adultes. Les DLBCL peuvent être caractérisés par leur localisation, leur morphologie ou leur profil d'expression génique (Swerdlow et al., 2016). En



effet les patients peuvent présenter des signes de la maladie dans les ganglions, en extra ganglionnaire, dans le médiastin ou dans le système nerveux central. Les tumeurs consistent en une prolifération diffuse de lymphocytes atypiques de taille moyenne à grande qui peuvent ressembler à des cellules centroblastiques, immunoblastiques, ou anaplasiques (cellules ayant perdues leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de leur contrepartie non tumorale). Les cellules néoplasiques expriment les antigènes des lymphocytes B tels que CD19, CD20, CD79a et PAX5 et expriment de façon variable la protéine anti-apoptotique Bcl2.

Une analyse transcriptomique a révélé l'existence de deux sous-types de DLBCL qui sont probablement le reflet de processus transformant divergents : le sous-type GC-DLBCL (*Germinal Center like*) dont le phénotype est proche de celui d'une cellule B du centre germinatif, le sous-type ABC-DLBCL (*Activated B cell like*) de phénotype activé (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2003; Savage et al., 2003).

Les altérations de *c-myc* dans les DLBCL peuvent être dues à des translocations (5 à 14%), un gain de copie (une à deux copies du gène) (19 à 38%), une amplification (nombre de copie du gène supérieur à trois) (2%) ou encore à des mutations (32%) (Nowakowski and Czuczman, 2015; Pasqualucci et al., 2001; Stasik et al., 2010; Valera et al., 2013). Les translocations peuvent être associées avec les loci de *IgH*, mais à la différence des lymphomes de Burkitt, elles sont plus fréquentes avec des loci de *IgL* (Cai et al., 2015). Les mutations peuvent induire un changement de promoteur de P2 à P1 comme dans le lymphome de Burkitt, ou encore modifier le profil de phosphorylation de c-Myc permettant ainsi d'augmenter la stabilité de la protéine (Pasqualucci et al., 2001). Les altérations de *c-myc* dans les DLBCL sont associées à une diminution du taux de survie des patients. On ne sait pas si le mauvais pronostic est attribuable aux altérations de *c-myc* seules, ou au fait que 58 à 83% des translocations de *c-myc* dans les DLBCL sont associées à une ou deux autres translocations touchant les gènes *bcl2* et/ou *bcl6* (Ueda et al., 2004; Valera et al., 2013).

Parmi les sous-groupes de DLBCL, les ABC DLBCL ont la plus forte expression de c-Myc. La stimulation des cellules B normales par une variété de récepteurs de surface cellulaires augmente l'expression de c-Myc et, en particulier, la voie de signalisation NF-κB peut augmenter la transcription de c-Myc (Schauer et al., 1996). Par conséquent, l'activité constitutive de la voie NF-κB dans les ABC DLBCL peut contribuer à l'expression élevée de c-



Myc. Cependant, la régulation transcriptionnelle de c-Myc est complexe et il est peu probable que ce soit l'explication complète de l'expression élevée de c-Myc dans ce sous-type de DLBCL.

I.1.6.3. C-Myc et myélome multiple (MM).

Le myélome multiple (MM) est un cancer des plasmocytes avec un phénotype post centre germinatif proche des plasmocytes normaux à longue durée de vie de la moelle osseuse. Les plasmocytes à longue durée de vie apparaissent lors de la réponse immunitaire secondaire après la commutation de classe des immunoglobulines. Le MM est habituellement précédé par une phase MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*) qui évolue en MM (Landgren et al., 2009; Weiss et al., 2009). Les MM ont un faible taux de recirculation des plasmocytes dans les premiers stades. Cependant, cette fraction de cellules augmente au cours de la progression pour ainsi permettre la dissémination du MM (Affer et al., 2014).

Il existe maintenant sept partenaires chromosomiques récurrents impliqués dans des translocations avec le locus IgH (14q32) dans environ 40% des tumeurs MM (Bergsagel et al., 2013). Il existe trois groupes récurrents de translocation IgH (Kuehl and Bergsagel, 2002) :

- CYCLINE D: 11q13 (*Cyclin D1*), 15% ; 12p13 (*Cyclin D2*), <1%; 6p21 (*Cyclin D3*), 2%;
- MAF: 16q23 (*c-MAF*), 5%; 21q12 (*MAFB*), 2%; 8q24.3 (*MAFA*), <1%
- MMSET/FGFR3: 4p16 (*MMSET*), 15%.

Pour le locus IgH les points de rupture de ces translocations se produisent habituellement à l'intérieur ou à proximité des régions de commutation de classe. Mais ils se produisent parfois à l'intérieur ou à proximité de séquences VDJ, ce qui suggère que ces translocations sont médiées par des erreurs dans la recombinaison du locus IgH lors de la commutation de classe ou dans les hypermutations somatiques des régions variables des Ig médiées par AID (*Activation-Induced Deaminase*) (Chng et al., 2011).

Les translocations du gène *c-myc* peuvent impliquer les loci d'immunoglobuline et apparaissent comme un évènement secondaire (Kuehl and Bergsagel, 2002). En utilisant la technique FISH pour localiser les gènes sur les chromosomes, il a été observé que ces translocations ne sont presque jamais vues dans les MGUS (3% des cas), mais sont retrouvées



dans 15% des MM non traités, dans 50% des MM réfractaires et dans plus de 90% des lignées cellulaires de MM. Ces réarrangements placent *c-myc* près d'une grande variété de « *super-enhancers* » comme par exemple les régions régulatrices du locus IgH ou Igλ, fortement activé, ce qui conduit à une cis-dérégulation de *c-myc* (l'expression de c-Myc sera régulée par une région régulatrice fortement active) (Chesi and Bergsagel, 2015). Cette surexpression induit un phénotype de la maladie plus agressif (diminution de la survie globale). Les translocations classiques t(8;14) et t(8;22) ne correspondent qu'à 10% et 5% des anomalies de caryotypes de *c-myc* observées dans le MM (Dib et al., 2008). Au lieu de cela, la plupart des anomalies de caryotypes impliquant *c-myc* sont des translocations complexes impliquant souvent trois chromosomes différents (Dib et al., 2008; Kuehl and Bergsagel, 2002).

Comme énoncé précédemment les translocations qui impliquent le gène *c-myc* sont des événements secondaires, elles sont rares ou absentes dans les MGUS, mais se produisent dans 15% des tumeurs de MM (Avet-Loiseau et al., 2001). Les plasmocytes normaux sont dépendants du stroma, en effet, l'expression biallélique de c-Myc est stimulée par l'interleukine 6 (IL-6) et d'autres cytokines présentes dans le microenvironnement lors des phases précoces de la tumorigenèse (Chng et al., 2011). Les réarrangements de *c-myc* sont censés représenter un événement de progression très tardif qui permet aux plasmocytes de devenir moins dépendants des cellules stromales et/ou plus prolifératives. La dérégulation de c-Myc pourrait conduire à la progression du MGUS vers le MM. Il a été montré dans une lignée murine (Vκ**Myc*) (cf I.1.7.7), que l'activation sporadique (dépendant de l'activité de AID (Chesi et al., 2008) de c-Myc dans les cellules B du centre germinatif aboutit à des MM dans la majorité des souris.

I.1.7. Modèles murins de lymphomagenèse c-Myc dépendant.

Plusieurs modèles animaux ont été développés afin de comprendre comment la dérégulation de c-Myc pouvait contribuer au processus de tumorigenèse et ainsi décrypter les mécanismes et les coopérations mis en jeu lors de la lymphomagenèse.



I.1.7.1. Le modèle E μ -myc.

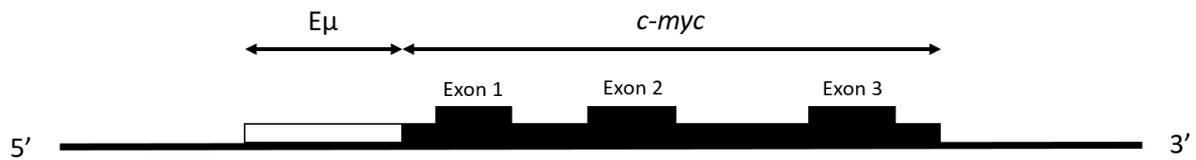


Figure 11 : Représentation schématique de la construction du modèle murin E μ -myc. (Modifié à partir de (Adams et al., 1985)). Le gène *c-myc* composé de ses 3 exons est placé sous le contrôle de la région régulatrice E μ de la chaîne lourde de l'immunoglobuline IgH.

Le modèle murin E μ -myc a été développé en 1985 (Adams et al., 1985). Ces souris expriment le transgène *c-myc* placé sous le contrôle de la région régulatrice E μ de la chaîne lourde de l'immunoglobuline. Le transgène E μ -myc porte les trois exons de *c-myc* sous le contrôle de la région régulatrice E μ comme dans les lymphomes de Burkitt endémiques (Blum et al., 2004). Ainsi les auteurs ont voulu mimer la surexpression de c-Myc que l'on retrouve dans le lymphome de Burkitt. La construction du transgène E μ -myc est injectée dans des ovules fertilisés puis ces ovules seront insérés dans une femelle pseudo gestante (**Figure 11**). Ces souris développent des lymphomes pré-B et des lymphomes B matures après 4 à 6 mois. Tous les lymphomes dans ce modèle sont clonaux et donc issus de la même cellule d'origine comme ce qui est retrouvé dans le lymphome de Burkitt humain (Klapproth and Wirth, 2010).

Dans le lymphome de Burkitt, la translocation de *c-myc* est suivie d'évènements oncogéniques secondaires. Pour étudier ces évènements, différentes équipes ont croisé les souris E μ -myc avec d'autres modèles murins avec dérégulation d'oncogène. Il a ainsi été montré que v-H-ras et v-raf sont capables d'accélérer la cinétique d'apparition des tumeurs dépendante d'E μ -myc (Langdon et al., 1989).

Cependant, c-Myc a aussi un rôle pro-apoptotique (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992) et sensibilise à l'apoptose les lymphocytes B (de Alborán et al., 2004). Une des protéines jouant un rôle important contre l'induction de l'apoptose est Bcl2. Bcl2 est une protéine anti-apoptotique fréquemment dérégulée dans les lymphomes (Gaulard et al., 1992; Schena et al., 1992; Andreeff et al., 1999). Des modèles murins double transgénique E μ -myc/*bcl-2* obtenu en croisant le modèle E μ -myc et le modèle E μ -*bcl-2* (Strasser et al., 1990) ou avec la construction tet-*bcl-2*/MMTV-tTA (*bcl-2* régulable pas la tétracycline) ont été créés. Ces souris doubles transgéniques E μ -myc/*bcl-2* présentent une lymphomagenèse accélérée par rapport

aux modèles simples transgéniques, ce qui indique la coopération entre ces deux oncogènes (Letai et al., 2004; Strasser et al., 1990). Un modèle E μ -myc avec la mutation inactivatrice de p53 et/ou la mutation de INK4a/ARF (suppression de l'inhibition de p53) conduit à une tumorigenèse plus agressive montrant l'importance de l'inactivation de la voie p53 (Schmitt et al., 1999). C-Myc coopère avec Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*), un répresseur transcriptionnel d'INK4a/ARF. Ils inhibent l'apoptose dépendante de INK4a/ARF induite par c-Myc, dans le modèle E μ -myc (Jacobs et al., 1999).

On peut également citer d'autres études avec ce modèle E μ -myc qui ont montré l'interaction avec d'autres protéines ou mutations jouant un rôle dans la régulation de l'apoptose qui permettent d'accélérer la lymphomagenèse, montrant ainsi l'importance d'évènements secondaires dans les mécanismes tumoraux de ce modèle murin. Sur la protéine normale c-Myc, la phosphorylation de la Ser62 et la Thr58 permet la fixation de la peptidyl prolyl-isomérase Pin1, qui favorise la déphosphorylation de la Ser62 et la dégradation de c-Myc par le protéasome. La délétion de Pin1 chez les souris transgéniques E μ -Myc réduit la lymphomagenèse. Cet effet n'est pas dû à son activité connue sur c-Myc ou p53 (régulation de sa stabilité par des phosphorylations (Wulf et al., 2002)). Dans les cellules déficientes en Pin-1, la réponse proliférative à l'oncogène c-Myc est altérée sans aucune altération de l'apoptose induite par c-Myc ou l'entrée dans le cycle cellulaire. Ce défaut de prolifération n'est pas attribuable aux altérations de la phosphorylation Ser62 ou de la transcription régulée par c-Myc. Pin1 serait nécessaire pour empêcher l'accumulation d'une réponse cytostatique dépendante de la voie ARF/p53 (D'Artista et al., 2016).

La délétion de c-Rel dans le modèle murin E μ -myc a permis de montrer le rôle suppresseur de tumeur de c-Rel. Les souris *c-rel*^{-/-} / E μ -Myc développent des tumeurs plus rapidement que dans les souris E μ -myc simple. Cette effet est expliqué par la régulation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bach2 (*BTB Domain And CNC Homolog 2*) (Hunter et al., 2015).

Le modèle E μ -myc n'est pas vraiment un bon modèle de lymphome de Burkitt. En effet, ce modèle développe également des lymphomes pré-B, ce qui serait dû au fait que la région régulatrice E μ est aussi active dans les stades pré-B. Ce modèle permet tout de même de surexprimer c-myc entraînant ainsi l'apparition de lymphomes agressifs et clonaux. Ce modèle



a permis l'étude de la synergie avec des évènements secondaires, notamment ceux ciblant l'apoptose mais aussi les voies d'activation cellulaire.

I.1.7.2. Le modèle Igλ-myc.

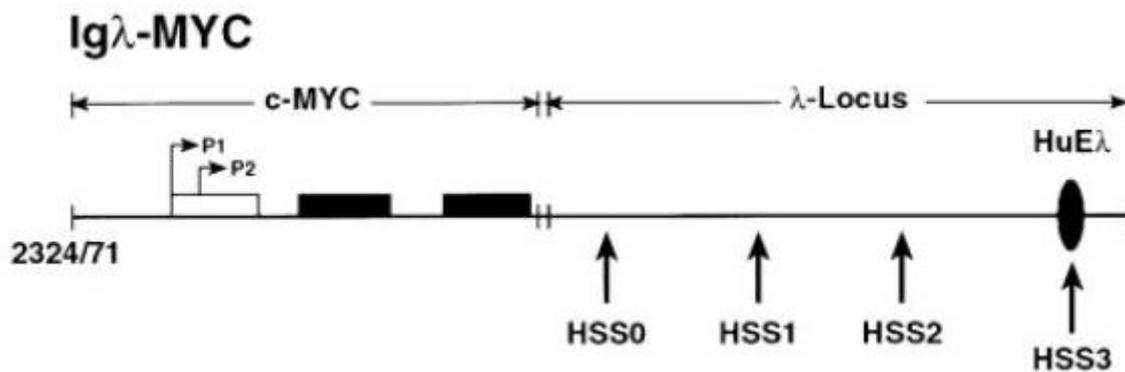


Figure 12 : Représentation schématique de la construction du modèle murin Igλ-myc (modifié à partir de (Kovalchuk et al., 2000)). Les flèches horizontales indiquent les deux promoteurs de c-myc, P1 et P2, situés dans le premier exon non codant (rectangle ouvert), les deux exons codants sont représentés par des rectangles pleins. Les flèches verticales indiquent les emplacements des quatre sites DNaseI-hypersensibles (HSS) dans la région de contrôle du locus Igλ. Le gène c-myc sera ainsi sous le contrôle des éléments régulateurs du locus de la chaîne λ des immunoglobulines. Le transgène c-myc ne sera donc exprimé que dans les cellules B.

En 2000, le modèle murin Igλ-myc a été publié par Kovalchuk et al. (Kovalchuk et al., 2000). Dans ce modèle, le gène humain c-myc est sous le contrôle de la région régulatrice du locus de la chaîne légère lambda des immunoglobulines (**Figure 12**). Le gène c-myc est issu d'une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt humain IARC-BL60. Ce gène est muté dans sa région 5' ce qui permet le shift du promoteur P2 vers P1 (Strobl et al., 1993). Le transgène est intégré au génome de façon aléatoire dans des ovules fertilisés, et les souris obtenues peuvent avoir plusieurs copies du transgène. Cependant il a été observé que le nombre de copies n'influçait pas la lymphomagenèse. Ces souris meurent à cause du développement de tumeurs entre 38 et 216 jours, avec une valeur médiane à environ 125 jours. Ces souris développent des lymphomes B matures. Les ganglions et les rates de souris porteuses de tumeurs sont constitués d'une population clonale de cellules homogènes IgM⁺CD19⁺CD5⁻CD23⁻, un phénotype similaire à celui du lymphome de Burkitt humain. D'un point de vue histologique, les tumeurs obtenues ont l'aspect de « ciel étoilé » dû à la présence de macrophages, une des caractéristiques morphologiques du lymphome de Burkitt (Kovalchuk

et al., 2000). Les tumeurs développées par ces souris sont fréquemment associées à des mutations de *tp53* comme dans les lymphomes de Burkitt (Biegung et al., 2009).

Les lymphomes de Burkitt étant associés à l'EBV, un certain nombre d'études ont porté sur l'étude de l'association de l'EBV (expression de ses différentes protéines) et de la dérégulation de c-Myc. Parmi celles-ci, il a été montré dans le modèle Igλ-myc que la protéine de l'EBV LMP2A (*Latent Membrane Protein 2A*), qui mime le BCR (*B Cell Receptor*), augmente l'effet oncogène de c-Myc. LMP2A favorise l'effet prolifératif de c-Myc et augmente l'instabilité du suppresseur de tumeur p27^{kip1}. En effet LMP2A promeut la dégradation de p27^{kip1} par le protéasome (Fish et al., 2014).

Ce modèle confirme le pouvoir oncogénique de c-Myc. Il permet d'obtenir un modèle qui reflète au mieux le mode d'activation de c-Myc dans le contexte de translocation observées dans les lymphomes de Burkitt. Dans le modèle Eμ-myc, décrit précédemment, le transgène est activé dans les stades pré-B comme dans les stades B matures (post recombinaison VDJ). Alors que dans le modèle Igλ-myc, c-Myc ne sera activé que dans les cellules B matures, pour ainsi donner des lymphomes B matures. Le contexte chromosomique est donc très important.

1.1.7.3. Le modèle c-myc-3'IgH LCR.

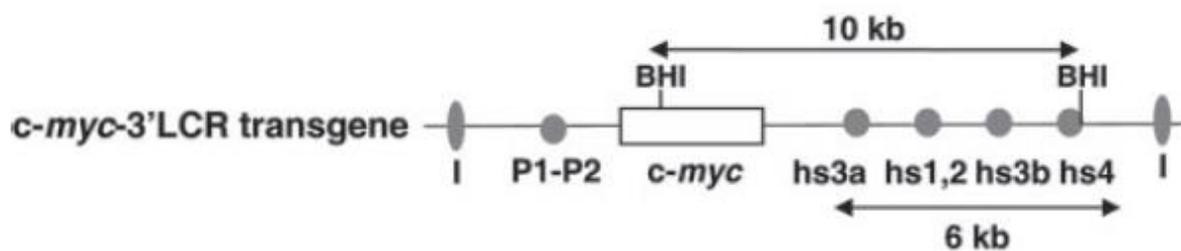


Figure 13 : Représentation schématique de la construction du modèle murin c-myc-3'IgH LCR (modifié à partir de (Truffinet et al., 2007)). P1 et P2 sont les promoteurs de c-myc. Le gène humain c-myc est sous le contrôle de la région régulatrice 3' du locus IgH. Le transgène de c-myc ne sera donc activé que dans les cellules B du stade pré-B au stade B mature.

Le modèle murin c-myc-3'IgH LCR a été développé dans notre UMR CNRS pour mimer la dérégulation de c-myc par la région 3'RR, comme dans les lymphomes de Burkitt caucasien (Figure 9). Dans ce modèle, le gène murin c-myc avec ses trois exons est sous le contrôle de la région 3' du locus IgH (contenant les quatre régions régulatrices : hs3a, hs1,2, hs3b et hs4) (Figure 13). Le transgène est intégré dans le locus IgH par « knock-in » dans les cellules ES. A

partir de l'âge de 12 semaines, les souris transgéniques développent des lymphomes « *BL-like* » clonaux ou des lymphomes B diffus anaplasiques avec une incidence globale de 80% en 40 semaines. Les lymphomes « *BL-like* » sont B220⁺IgD⁺ IgM⁺ avec l'aspect de "ciel étoilé" spécifique du lymphome de Burkitt. Cette étude démontre que la région régulatrice 3' du locus IgH peut déréguler *c-myc* et initier le développement de lymphomes *Burkitt-like* (Truffinet et al., 2007). D'autres études au sein de l'équipe ont montré l'effet de la mutation de *cdk4*, rendant cette cycline insensible à la régulation par p16^{INK4}, dans ce modèle *c-myc-3'IgH* LCR. CDK4 favorise l'effet de c-Myc dans la formation de lymphomes du manteau. En effet, l'expression d'une protéine CDK4 mutée dans ce modèle murin permet la promotion de la lymphomagenèse (Vincent-Fabert et al., 2012). Un signal tonique du BCR (signal indépendant de l'antigène), permettant la survie cellulaire, peut moduler la lymphomagenèse dépendant de c-Myc. Ce signal peut être différent selon l'isotype, IgM (comme dans le lymphome de Burkitt) ou IgA. Pour tester cette hypothèse le modèle *c-myc-3'IgH* LCR a été croisé avec un modèle portant la mutation du locus IGH (souris α 1KI). Cette mutation remplace l'expression d'IgM/IgD par l'expression prématurée d'IgA. Un signal tonique du BCR de type IgA retardera la lymphomagenèse comparativement à un BCR de type IgM. De plus dans le cas d'un BCR IgA, les cellules tumorales seront plus avancées dans le stade de développement B, et les tumeurs sont moins agressives. Ces observations indiquent que la classe d'Ig module la progression tumorale et son phénotype (Amin et al., 2014).

Ce modèle permet le développement de lymphomes très divers en association avec d'autres processus oncogéniques dérégulés. De plus ce modèle induit une lymphomagenèse dépendant de c-Myc avec seulement les éléments régulateurs de la chaîne lourde d'immunoglobuline en 3'.

I.1.7.4. Le modèle IgH/c-mycYAC.

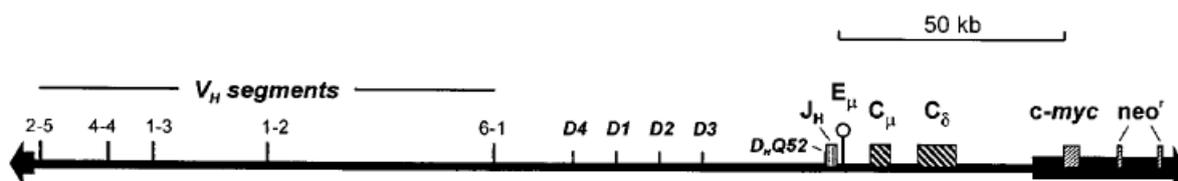


Figure 14 : Représentation schématique de la construction du modèle murin IgH/c-myc YAC (modifié à partir de (Bützler et al., 1997)). Le gène humain de *c-myc* comportant ses 3 exons contenu dans un

chromosome artificiel de levure (YAC) est placé à 50kb du régulateur E μ . Le transgène de c-myc ne sera donc activé que dans les cellules B du stade pré-B au stade B mature.

En 1997, un modèle original de translocation de *c-myc* a été développé. En effet ce modèle murin possède l'insertion du gène *c-myc* dérivé d'une lignée cellulaire humaine de lymphome de Burkitt, Raji (Hamlyn and Rabbitts, 1983) à environ 50 kb de la région régulatrice d'IgH (E μ). Ce transgène est dans un chromosome artificiel de levure (YAC) contenant une région de 220 kb du locus de la chaîne lourde d'Ig humaine (IgH). Une copie unique de ce YAC est intégrée dans le génome des cellules souches embryonnaires (ES) des souris (**Figure 14**). Les souris chimériques dérivées de ces cellules ES développent des lymphomes B monoclonaux exprimant une IgM à leur surface entre 8 et 16 semaines. La pathologie observée dans ces souris IgH/*c-myc*YAC ressemble à celle de cellules B de LAL (leucémie aigue lymphoblastique). Comme pour les tumeurs qui se développent dans les souris IgH/*c-myc*YAC, les LAL sont caractérisées par la présence de grandes cellules B avec une translocation du gène *c-myc*. Cette translocation est habituellement dans le locus IgH. Ces cellules peuvent infiltrer la moelle osseuse et conduire à des tumeurs abdominales. Les souris développent une splénomégalie, des tumeurs dans l'abdomen, la tête et moins fréquemment dans la poitrine. Il n'est pas observé de tumeur dans les ganglions, dans les plaques de Peyer ou dans les autres organes tels que le foie, les reins ou encore les poumons. (Bützler et al., 1997). Il est à noter que la délétion de la région régulatrice E μ n'influence pas le développement de lymphome B dans le modèle IgH/*c-myc*YAC. La lymphomagenèse se fait en présence ou en absence d'E μ . L'expression de c-Myc serait due à d'autres éléments régulateurs présents dans le locus IgH (Palomo et al., 1999).

Dans ce modèle, la technique utilisée permet d'avoir une seule copie de transgène intégrée dans le génome, ce qui est suffisant pour induire la tumorigenèse. Les tumeurs induites dans ce modèle se sont développées sous forme de masses tumorales à l'intérieur du crâne, dans l'abdomen et / ou dans la poitrine sans implication de ganglions lymphatiques à la différence des autres modèles présentés.



I.1.7.5. Le modèle iMyc^{Cα}.

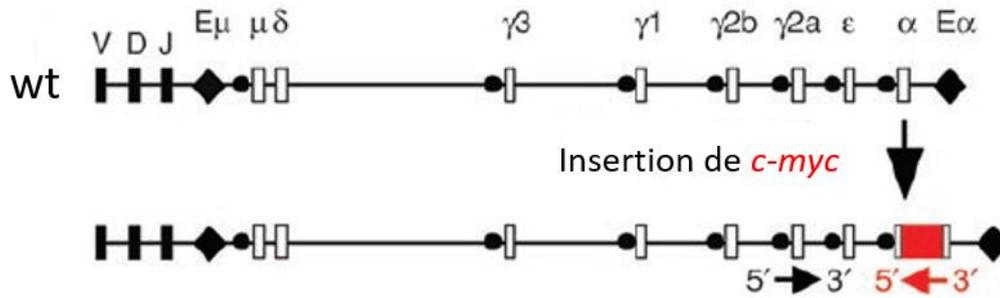


Figure 15 : Représentation schématique de la construction du modèle murin *c-myc*. *Cα/IgH* (modifié à partir de (Cheung et al., 2004)). Le gène murin *c-myc* (en rouge) est inséré dans le segment constant *Cα* du locus *IgH*. Le transgène de *c-myc* ne sera donc activé que dans les cellules B du stade pré-B au stade B mature.

L'insertion par recombinaison homologue de *c-myc* dans le segment constant *Cα* au locus *IgH* mime la translocation T(12;15) la plus fréquemment observée dans le PCT (*Plasma cell tumor*) péritonéal de souris BALB/c plaçant le gène *c-myc* sous le contrôle de la région régulatrice 3' *IgH* (**Figure 15**). Ce modèle iMyc^{Cα} a un faible potentiel oncogénique. C'est pourquoi ce modèle a été croisé avec un autre modèle possédant le transgène *bcl-xl* contrôlé par la région régulatrice 3' du gène murin *Igκ* (Linden et al., 2004). En effet le gène *bcl-xl* est fréquemment dérégulé dans les tumeurs des plasmocytes humains (PCN : *human plasma cell neoplasms*) comme dans le myélome multiple (tumeurs disséminées) et les plasmocytomes (tumeurs localisées) (Tu et al., 1998). Au bout de 135 jours ces souris développent des tumeurs des plasmocytes, l'incidence des tumeurs est de 100% (Cheung et al., 2004).

Ce modèle de souris iMyc^{Cα} peut être utile pour élucider le mécanisme de la collaboration c-Myc/Bcl-XL et pour concevoir de nouvelles approches pour le traitement des plasmocytomes humains.

I.1.7.6. Le modèle iMyc^{Eμ}.

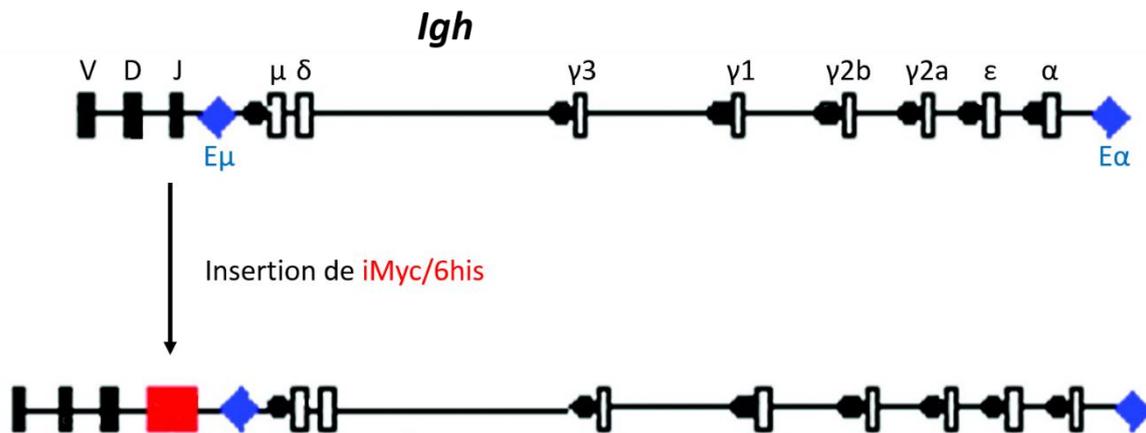


Figure 16 : Représentation schématique de la construction du modèle murin iMyc(*Eμ*) (modifié à partir de (Park et al., 2005)). Le gène murin *c-myc/6his* (en rouge) est inséré en amont de l'enhancers *Eμ* (en bleu) du locus *IgH*. Le transgène de *c-myc* ne sera donc activé que dans les cellules B du stade pré-B au stade B mature.

Le modèle iMyc(*Eμ*) présente une insertion du gène *c-myc* murin, avec 6 histidines en 3' du gène, dans la région JH du locus *IgH*. Ces histidines permettent de différencier le produit issu du transgène par rapport à celui endogène. Cela mime la translocation t(8;14)(q24;q32) qui est retrouvée dans les lymphomes de Burkitt humain endémiques (**Figure 16**). A partir de 6 mois, ces souris transgéniques développent des lymphomes « *Burkitt-like* » à cellules B IgM⁺, des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) Bcl-6⁺ (type GC) et des plasmocytomes CD138⁺, avec une incidence globale de 68% en 21 mois. Les études moléculaires de la néoplasie la plus répandue « *Burkitt like* » (50% de toutes les tumeurs), montrent que les tumeurs sont clonales. Ces tumeurs surexpriment *c-Myc* (His), et présentent le changement du promoteur P2 à P1, une caractéristique de la dérégulation de *c-Myc* dans le lymphome de Burkitt endémique (Park et al., 2005).

Ce modèle transgénique iMyc^{Eμ} mime le lymphome de Burkitt endémique t(8;14) en majorité ainsi que des tumeurs de plasmocytes. Le long temps d'apparition des tumeurs des cellules B et des cellules plasmatiques chez ces souris suggère que des événements oncogéniques secondaires interviennent dans la lymphomagenèse dépendante de *c-Myc*.

I.1.7.7. Le modèle Vk*MyC.

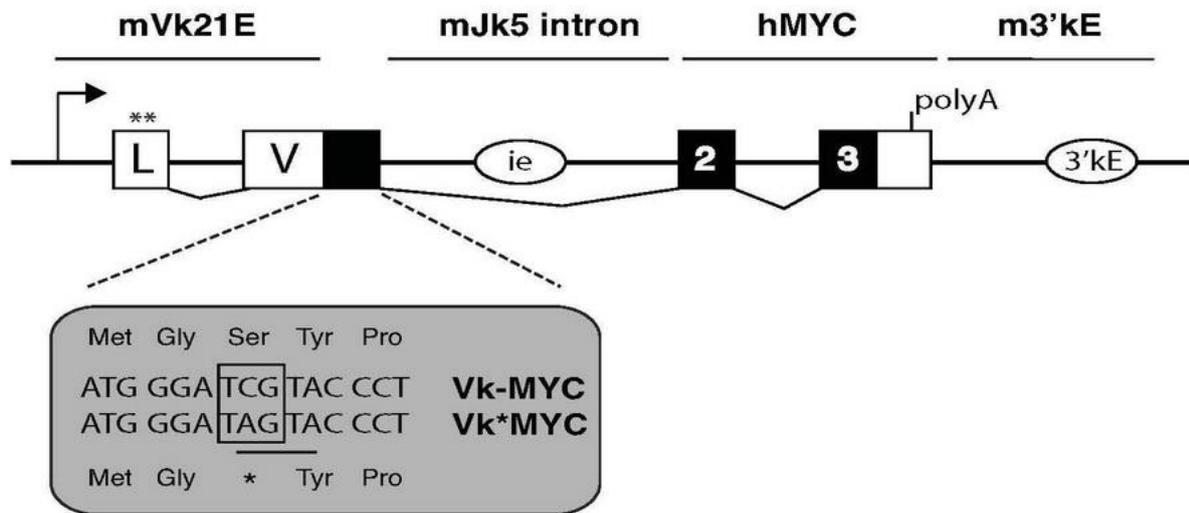


Figure 17 : Représentation schématique de la construction du modèle murin $V\kappa^*MyC$ (modifié à partir de (Chesi et al., 2008)). La région $C\kappa$ de l'exon $V\kappa$ a été remplacée par une partie du gène de $c-myc$ humain (exons 2 et 3). La transcription est initiée au promoteur proximal $V\kappa 21E$ (flèche), le gène de $c-myc$ se termine au signal $polyA$ endogène (illustré). Dans le panneau gris sont montrées la séquence nucléotidique et d'acides aminés du premier exon codant du transgène: l'initiation de la traduction ATG ; le codon muté $TCG > TAG$ est encadré, et la séquence nucléotidique, point chaud pour hypermutation somatique (HMS), est souligné. Le codon stop stoppe la transcription. La séquence du codon stop étant un point chaud pour l'activité d' AID (Activation Induced Deaminase : enzyme impliquée dans la HMS), la séquence sera changée et la transcription du transgène $c-myc$ pourra se faire.

Le modèle $V\kappa^*MyC$ possède l'exon V -kappa et l'exon 2 et 3 du gène humain $c-myc$. Dans l'exon V -kappa, le 3^{ème} codon a été muté en un codon STOP ($TCG \rightarrow TAG$) (Figure 17). Dans cette construction $V\kappa^*MyC$, la traduction est prématurément arrêtée à cause du codon STOP et la protéine $c-Myc$ n'est pas exprimée. Ce codon STOP est créé par un motif $DGYW$ qui représente une séquence cible préférentielle connue pour la HMS (hypermutation somatique). Cela aboutit à des mutations réverses qui lèvent ainsi le codon STOP, permettant l'expression de $c-Myc$ dans le centre germinatif (GC). Ce modèle permet une expression fine du transgène à un moment précis du développement B. Les souris $V\kappa^*MyC$ développent toutes des tumeurs post-GC très proche d'un myélome multiple indolent avec des propriétés biologiques et cliniques très caractéristiques de la pathologie humaine. Le croisement de ce modèle avec le modèle $E\mu-bcl2$ induit des tumeurs de cellules plasmiques monoclonales extra médullaires agressives avec infiltration des ganglions lymphatiques et de la rate (Chesi et al., 2008). Bien que l'agressivité, la localisation et l'immunophénotype de ces tumeurs

ressemblent à celles des souris $iMyc^{Ca}$ /Bcl-XL (Cheung et al., 2004), elles diffèrent car ils ont toutes une origine post-GC car les cellules tumorales ont subi la HMS.

I.1.7.8. Le modèle tTA/Myc.

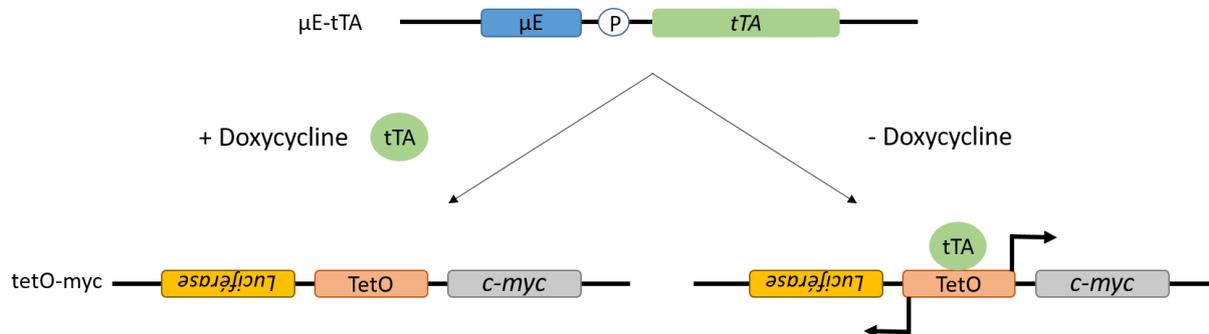


Figure 18 : Représentation schématique de la construction du modèle murin μE -tTA/tetO-myc (modifié à partir de (Marinkovic et al., 2004)). Le gène codant pour tTA est sous le contrôle de μE . En absence de doxycycline, tTA active le promoteur TetO et permet la transcription de c-myc et de la luciférase.

Le modèle tTA/Myc est un modèle dans lequel c-Myc est conditionnellement exprimé dans les cellules B et T en utilisant le système de régulation des gènes contrôlé par la tétracycline (Marinkovic et al., 2004). Chez ces souris, le tTA (*tetracycline-transactivator*) est sous le contrôle de l'élément régulateur μE (spécifique des cellules lymphoïdes (Annweiler et al., 1992)) et d'un promoteur minimal (P), et est exprimé spécifiquement dans les lymphocytes B et T. Ce transactivateur active alors la transcription d'une seconde cassette de transgène constituée du proto-oncogène c-Myc humain (exon 2 et 3), un gène rapporteur codant pour la luciférase et d'un promoteur bidirectionnel (TetO) (**Figure 18**). En présence de doxycycline, les expressions de c-Myc et de la luciférase sont abolies. Ces souris tTA/Myc ont une vie moyenne de 13 semaines. Elles développent des lymphomes T et des lymphomes B dans respectivement 74,3% et 25,7% des cas. Les souris développant un lymphome T présentent un élargissement du thymus, de la rate, du foie et parfois des ganglions mésentériques. Quant aux souris développant un lymphome B, elles présentent un élargissement des ganglions (inguinaux, cervicaux et brachiaux), de la rate, du foie et parfois du thymus. Les lymphomes B observés dans ce modèle ressemblent aux lymphomes développés par les modèles de lymphomes de Burkitt ($IgM^+/CD43^+/CD23^{low}$). Lors du traitement avec de la doxycycline des souris porteuses de tumeur, les cellules perdent rapidement l'expression de la protéine c-Myc transgénique, ce qui entraîne un arrêt de la croissance au stade G1 du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. La régression tumorale et l'apoptose sont également apparentes

chez les souris après l'inactivation de c-Myc. Ces données démontrent que tous les lymphomes dépendaient de l'expression continue de c-Myc (Marinkovic et al., 2004).

Sur le même principe, le modèle EμSR-tTA / tetO-Myc a été développé auparavant (Felsher and Bishop, 1999). C-Myc est exprimée dans les lignées hématopoïétiques. En absence de doxycycline, les souris meurent au bout de 5 mois de tumeurs invasives. Les tumeurs se sont manifestées par un grossissement du thymus, du foie, de la rate et l'apparition de masses dans la partie gastro-intestinal. L'histologie des tumeurs ressemble à un lymphome diffus à grandes cellules, qui effaçait l'architecture du thymus, de la rate et de la moelle osseuse. Les cellules tumorales ont également envahi le sang périphérique, le rein et le foie. L'invasion gastro-intestinale des ganglions lymphatiques mésentériques était accompagnée d'une invasion de la *lamina propria* du petit et du gros intestin. Sur les 16 tumeurs étudiées, 14 sont des lymphomes T de cellules CD4⁺ et CD8⁺ immatures, et 2 des leucémies myéloïdes aiguës. Lorsque les souris tumorales sont traitées avec de la doxycycline, 90% présentent une régression des tumeurs et 80% une rémission après 30 jours (Felsher and Bishop, 1999).

I.1.7.9. Le modèle Rosa26Stop^{FL}MYC.

Des souris transgéniques conditionnelles ont été générées par le ciblage de locus ROSA26. Ces souris portent une cassette STOP flanquée de séquence LoxP devant l'ADNc du gène *c-myc* humain (**Figure 19**). L'expression du transgène *c-myc* est contrôlée par le promoteur CAG, permettant une expression forte du transgène. Ces souris ont été croisées avec des souris Cy1-cre pour permettre le retrait de la cassette STOP spécifiquement dans les cellules B dans les centres germinatifs (Sander et al., 2012). Ces souris Rosa26Stop^{FL}MYC ne développent pas de tumeurs. Comme dit précédemment, le maintien d'un signal BCR permet de promouvoir la survie des cellules B via la voie PI3K (cf I.1.6.1). Un modèle murin double transgénique a été obtenu en croisant les souris Rosa26Stop^{FL}MYC avec des souris portant une cassette STOP flanquée de LoxP devant un ADNc codant pour une forme constitutivement active de PI3K, appelée P110*. La moelle osseuse de ces souris a été transférée dans des souris Rag2cg^{KO}. Ces souris présentent une déficience du système lymphatique en raison de l'absence de la recombinaison Rag2 (Shinkai et al., 1992). Macroscopiquement, ces souris avec de la moelle transférée présentent de grosses tumeurs provenant des plaques de Peyer de l'intestin grêle (tumeurs 12/21) ou d'autres organes lymphoïdes (rate, ganglions

lymphatiques) et infiltrant le foie et d'autres organes non lymphoïdes à un stade avancé. L'analyse histologique révèle une morphologie caractéristique des lymphomes de Burkitt. Comme dans le lymphome de Burkitt humain, les tumeurs présentent une morphologie en «ciel étoilé» en raison de l'envahissement des macrophages tissulaires qui éliminent les cellules tumorales apoptotiques. De plus le marquage au Ki67 montre un indice prolifératif de près de 100% dans les tumeurs. L'analyse des réarrangements des gènes de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) par Southern blot dans les tumeurs et les organes affectés a montré que les tumeurs sont monoclonales. Le profil d'expression des gènes de ces tumeurs ressemble à celui des lymphomes de Burkitt humain (Sander et al., 2012).

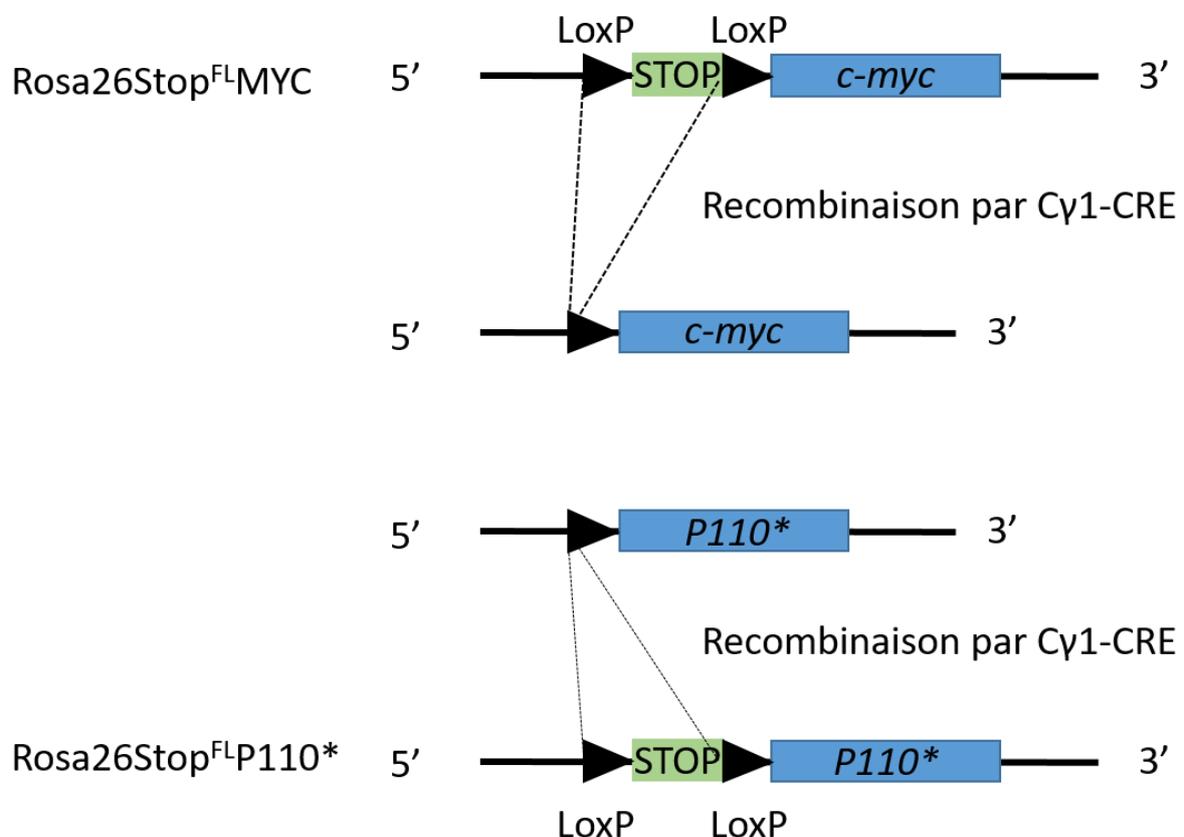


Figure 19 : Représentation schématique de la construction du modèle murin *Rosa26Stop^{FL}MYC* et *Rosa26Stop^{FL}P110** (modifié à partir de (Sander et al., 2012)). Les cassettes *STOP* flanquées par des séquences *LoxP* sont excisées grâce à la recombinaise *Cre* présente dans le locus *Cγ1*, et ainsi permettre l'expression de *c-myc* et *P110** (forme constitutivement active de *PI3K*) spécifiquement dans les cellules *B* des centres germinatifs.

I.1.7.10. Conclusions sur les différents modèles murins.

Ces différents modèles murins ont permis de modéliser les différentes translocations de *c-myc* retrouvées dans les pathologies humaines associées (Adams et al., 1985; Bützler et

al., 1997; Chesi et al., 2008; Cheung et al., 2004; Kovalchuk et al., 2000; Park et al., 2005; Truffinet et al., 2007). Il est intéressant de noter l'importance de *i)* la temporalité dans l'expression de c-Myc, *ii)* la localisation de la translocation et *iii)* l'environnement chromosomique.

Ces différences conduisent à des lymphomagenèses agressives mais avec des caractéristiques finales différentes, c'est-à-dire qu'elles vont mimer différents type de lymphomes.

Certains modèles développent des lymphomes qualifiés de « *Burkitt-like* » tels que le modèle Igλ-c-myc, les tumeurs sont issues de cellules B matures. Les modèles c-myc-3'IgH LCR et iMycEμ font également partie de cette catégorie. Ensuite, nous avons des modèles qui vont permettre de mimer les lymphomes non-Burkitt tels que le modèle Eμ-myc dans lequel c-Myc est surexprimé au stade pré-B et B mature conduisant à une hétérogénéité dans le développement des tumeurs. Le modèle IgH/c-mycYAC présente des caractéristiques proches des LAL. Pour finir, les modèles iMycCα, iMycEμ et Vκ*Myc vont mimer des développements de myélome.

Ces modèles permettent aussi de montrer que le phénotype des lymphomes de la lignée B induits par une dérégulation de c-Myc est fortement dépendant de la coopération entre les éléments régulateurs qui régissent l'expression de l'oncogène. En fonction, des éléments régulateurs en 5' ou 3' du transgène *c-myc*, on observe des différences dans la temporalité de l'expression de c-Myc. C-Myc peut être exprimée à différents stades du développement B selon le modèle, et entraîne une différence dans la nature du lymphome B.

Cependant ces modèles montrent une surexpression de c-Myc, mais ne miment pas les mutations de *c-myc* qui entraînent des gains de fonctions. Par exemple dans les lymphomes de Burkitt, *c-myc* peut être muté augmentant ainsi le potentiel oncogénique de l'oncoprotéine (Cai et al., 2015; Ott, 2014).

Ces modèles ont également permis de décrire différentes interactions que pouvait avoir c-Myc avec d'autres oncogènes comme ceux impliqués dans les voies de l'apoptose (p53, Bcl2, Bcl-xl). Cela permet ainsi une augmentation de la tumorigenèse dépendante de c-Myc. Les différentes voies dans lesquelles c-Myc intervient pour favoriser l'émergence de la pathologie peuvent alors être modélisées grâce aux différents modèles décrits. (Letai et al.,



2004; Marin et al., 1995; Palomo et al., 1999; Rouaud et al., 2012; Ueda et al., 2004; Vincent-Fabert et al., 2012). Ces modèles permettent ainsi une modélisation plus fidèle des différentes pathologies impliquant une translocation et/ou une surexpression de c-Myc. Et permettent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes conduisant aux différentes pathologies.

Pour finir, même si effectivement ces modèles développent des néoplasies des cellules B, elles diffèrent des translocations chromosomiques "naturelles" trouvées dans les tumeurs humaines. Tout d'abord, les translocations naturelles sont des événements géniques spontanés à l'origine de la tumeur, alors que dans ces modèles ce sont des modifications de la lignée germinale présente dans toutes les cellules. Seul un modèle a une expression précise dans le centre germinatif (V_k^*Myc). Deuxièmement, l'insertion ne reproduit que le produit c-Myc de la translocation, et non le produit réciproque de la translocation. Troisièmement, dans le lymphome de Burkitt endémique t(8;14), les points d'arrêt sur le chromosome 8 sont dispersés sur une distance génomique considérable dans le flanc 5' de *c-myc* (Joos et al., 1992; Shiramizu et al., 1991b), ce qui entraîne une séparation de *c-myc* et $E\mu$ de plus de 340 kb dans certains cas (Joos et al., 1992). Alors que dans ces modèles nous perdons cette notion de distance. Toutes critiques font que ces modèles ne reflètent pas entièrement tous les mécanismes mis en jeu.

I.2. Le facteur de transcription NF- κ B.

En 1986, NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) a été décrit biochimiquement pour la première fois comme un facteur nucléaire capable de se lier à la région régulatrice de la chaîne légère κ des immunoglobulines dans les lymphocytes B (Sen and Baltimore, 1986). L'association entre le facteur de transcription NF- κ B et l'ADN se fait sur des séquences consensus κ B : 5'-GGGRNWYYCC-3' (Où R=A ou G, W=A ou T, Y=C ou T et N=A, T, C ou G) (Zhang et al., 2017). Initialement décrit dans les lymphocytes B matures, le facteur de transcription NF- κ B est ubiquitaire. Il est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires, comme la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose. NF- κ B est constitutivement actif dans plusieurs pathologies, y compris les cancers, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme et des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique) (Courtois and Gilmore, 2006).



I.2.1. Les sous-unités NF- κ B

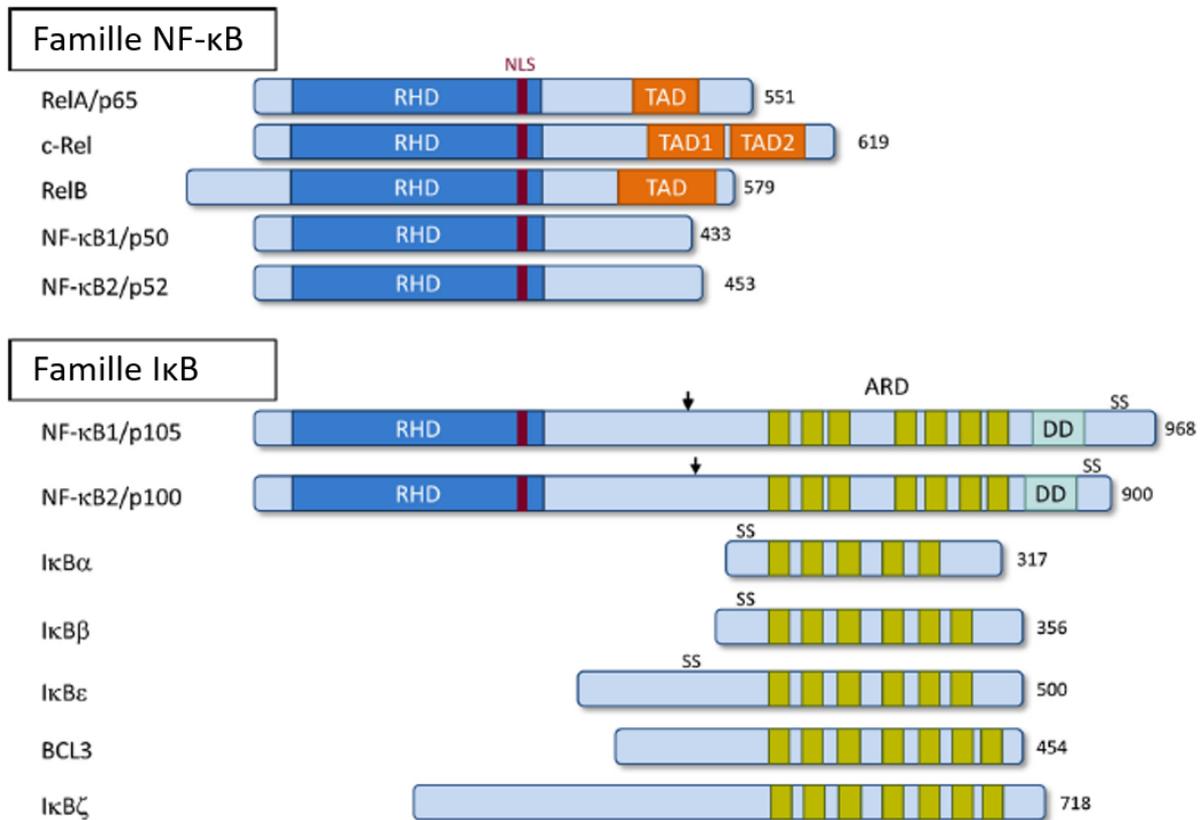


Figure 20 : Les membres de la famille NF- κ B et des protéines I κ B (Krappmann and Vincendeau, 2016). Le domaine d'homologie Rel (RHD) responsable de la dimérisation, la liaison ADN et l'inhibition par les protéines I κ B est la caractéristique commune pour les protéines NF- κ B. Le RHD contient une séquence de localisation nucléaire (NLS). Des domaines d'activation de la transcription (TAD) se trouvent dans l'extrémité carboxy-terminale de RelA, c-RelB et RelB. p50 et p52 sont générés lors du clivage des précurseurs p105 et p100. NF- κ B1/p105 et NF- κ B2/p100 appartiennent à la famille des protéines I κ B, qui partage un domaine de répétition ankyrine (ARD) constitué de 5 à 7 répétitions ankyrine. L'ARD médie l'interaction au RHD de NF- κ B. Tous principalement cytosolique I κ B (p105, p100, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) contiennent un motif sérine (SS), qui est phosphorylé par I κ B kinases (IKK) pour déclencher leur dégradation par le protéasome. Un domaine de mort (DD) en carboxy-terminal est retrouvé sur p105 et p100.

Les premières protéines REL clonées ont été la protéine virale aviaire v-Rel et son homologue cellulaire c-Rel (Chen et al., 1983; Stephens et al., 1983). Même si à l'époque on ne savait pas que REL et NF- κ B appartenaient à la même famille, la découverte du pouvoir oncogénique de v-Rel *in vitro* et *in vivo*, rétrospectivement, a été la première indication qu'une dérégulation de NF- κ B pouvait contribuer à la tumorigenèse (Barth et al., 1990; Gélinas and Temin, 1988). En 1990, la protéine p50 a été clonée pour la première fois. L'analyse de sa séquence a montré une homologie de plus de 300 acides aminés avec la partie N-terminale

de v-Rel et c-Rel. Cela a été l'une des premières preuves que p50 était un membre de la même famille de protéine que v-Rel et c-Rel (Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990). Les clonages ultérieurs des autres sous-unités de NF- κ B ont démontré la présence du même domaine REL (Bours et al., 1990, 1992; Ryseck et al., 1992; Schmid et al., 1991).

Il a été décrit cinq membres de la famille NF- κ B: p50 et son précurseur p105 (NF- κ B1), p52 et son précurseur p100 (NF- κ B2), RelA (p65), RelB et c-Rel (**Figure 20**). Ces sous-unités sont caractérisées par la présence d'un domaine hautement conservé, le domaine RHD (*Rel Homology Domain*) responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Verma et al., 1995). Les sous-unités RelA, RelB et c-Rel présentent également un domaine de transactivation dans la partie carboxy-terminale : TAD (*TransActivation Domain*). Les protéines p52 et p50 ne possèdent pas de domaine de transactivation. La régulation de la transcription est permise par la liaison avec les autres sous-unités. Leur précurseur p100 et p105 se distingue par la présence de plusieurs répétitions ankyrines dans la partie carboxy-terminale. Ces domaines ankyrines sont responsables de la localisation cytoplasmique de p100 et p105 car ils masquent la séquence du signal de localisation nucléaire (NLS). Les protéines p52 et p50 sont générées suite à une maturation protéolytique de leurs précurseurs respectifs p100 et p105 (Silverman and Maniatis, 2001). Les protéines p52 et p50, sous forme d'homodimères, peuvent également réprimer la transcription en se fixant au niveau des sites κ B, par compétition avec les autres dimères de NF- κ B (Lernbecher et al., 1993; May and Ghosh, 1997; Plaksin et al., 1993).

I.2.2. Les inhibiteurs I κ B.

L'activité de NF- κ B est régie par l'interaction avec les protéines inhibitrices I κ B. Il existe plusieurs protéines : les inhibiteurs « classiques » (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ), les précurseurs p100 (I κ B δ) et p105 (I κ B γ) et les inhibiteurs « atypiques » (BCL3 (*B cell CLL/lymphoma 3*), I κ B ζ , et I κ BNS). L'interaction des inhibiteurs classiques et des précurseurs p100 et p105 avec les protéines NF- κ B empêche leur transport vers le noyau grâce au masquage de leur séquence NLS (May and Ghosh, 1997). Les protéines I κ B ont une structure similaire avec des répétitions ankyrines, des sites de phosphorylation et d'ubiquitination permettant leur dégradation par le protéasome (**Figure 20**). Les membres de la famille I κ B sont régulés par phosphorylation et protéolyse. I κ B est phosphorylé au niveau des sérines S32 et S36 pour I κ B α , S19 et S23 pour I κ B β et S18 et S22 pour I κ B ϵ , puis ubiquitiné K48, permettant leur prise en charge par le

protéasome (Ghosh et al., 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). Les protéines IκB ont des différences d'affinités pour les sous-unités NF-κB. En effet, IκBα et IκBβ se lient préférentiellement aux hétérodimères RelA/p50 (Karin and Ben-Neriah, 2000; Weil et al., 1997). IκBε se lie préférentiellement aux complexes RelA/RelA et c-Rel/RelA (Whiteside et al., 1997). IκBζ (Yamamoto et al., 2004) et IκBNS (Hirotsu et al., 2005) interagissent tous deux avec la sous-unité p50. De plus, RelA est lié préférentiellement à p105 alors que RelB à p100.

BCL3 est différente des autres protéines IκB car BCL3 ne séquestre pas les complexes NF-κB dans le cytoplasme. Au lieu de cela, BCL3 est principalement une protéine nucléaire et possède un domaine de transactivation TAD. L'association entre BCL3 et les homodimères p50 et p52 permet l'activation des gènes grâce au TAD de BCL3 (Nolan et al., 1993).

I.2.3. Les voies d'activation de NF-κB.

On distingue 2 voies d'activation de NF-κB : la voie dite classique impliquant les sous-unités RelA, c-Rel et la voie dite alternative impliquant RelB.

I.2.3.1. La voie d'activation classique.

La voie d'activation classique de NF-κB est induite par un certain nombre de récepteurs comme celui du TNF-α (*Tumor necrosis factor alpha*) (Israël et al., 1989), de l'IL-1 (*Interleukine 1*), le BCR (*B cell receptor*) suite à la stimulation antigénique, ou les TLR (*Toll-like receptor*) en réponse à des stimuli bactériens et viraux (Krappmann and Vincendeau, 2016; Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Selon la nature du récepteur impliqué, l'activation de la voie NF-κB implique différentes protéines (**Figure 21**). Cette voie d'activation s'applique majoritairement aux complexes RelA/RelA, RelA/p50 et c-Rel/p50 (Zhang et al., 2017).



Voie classique

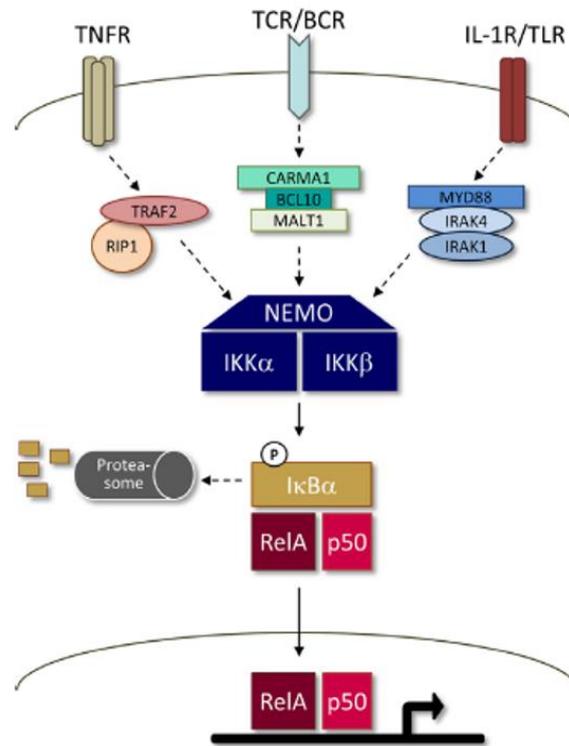


Figure 21 : La voie de signalisation classique de NF- κ B. La signalisation de la voie classique de NF- κ B est induite lors de l'activation des récepteurs de cytokines (par exemple TNFR, IL-1R), des récepteurs de l'immunité innée (TLR) ou des récepteurs d'antigènes (BCR ou TCR) et utilise une variété d'adaptateurs différents pour engager le complexe IKK constitué des sous-unités régulatrices NEMO et les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β . La phosphorylation par IKK de résidus sérine dans les inhibiteurs cytosoliques I κ B (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ) et des précurseurs (p105 et p100) déclenche leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome. Les dimères de la voie classique de NF- κ B comme p50/RelA et p50/c-Rel sont libérés et entrent dans le noyau pour induire la transcription de leurs gènes cibles. La voie classique de NF- κ B induit une réponse rapide, mais transitoire de la transcription (modifié à partir de : (Krappmann and Vincendeau, 2016).

La voie d'activation classique de NF- κ B est impliquée dans les réponses rapides et réversibles telles que l'inflammation. L'activation des dimères NF- κ B 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. En général, le système de conjugaison d'ubiquitine attache les chaînes de polyubiquitine aux protéines afin de réguler leurs fonctions. Le type de chaîne d'ubiquitine détermine le mode de régulation des protéines. Les chaînes de polyubiquitine sont générées par les actions répétées de trois classes d'enzymes: les enzymes activant l'ubiquitine (E1), les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et les ubiquitines ligases (E3). Comme évoqué ci-

dessus, l'ajout d'une chaîne d'ubiquitines K48 sur une protéine entraîne sa prise en charge et sa dégradation par le protéasome (comme pour I κ B α). À l'inverse, la fixation d'une chaîne d'ubiquitines sur la position K63 conduit à l'activation du substrat. Il existe un autre mode d'ubiquitination faisant intervenir le complexe LUBAC. LUBAC permet une polyubiquitination linéaire de la protéine (pour revue : (Komander and Rape, 2012)).

L'activation de NF- κ B nécessite l'activation préalable du complexe protéique IKK appelé «signalosome». Ce complexe multiprotéique de 700 à 900 kDa est composé des protéines kinases IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β) et la protéine régulatrice IKK γ aussi appelée NEMO (NF- κ B Essential MOdulator) (DiDonato et al., 1997; Yamaoka et al., 1998). IKK α et IKK β sont des sérines/thréonines kinases de 85 et 87 kDa. IKK α , IKK β contiennent un domaine basique « hélice-boucle hélice » qui module l'activité kinase et un motif « *Leucine Zipper* » impliqué dans les interactions protéines-protéines. NEMO possède un motif « *Leucine Zipper* » un motif UBAN (*ubiquitin binding in ABIN and NEMO proteins*) et des domaines « *coiled-coil* » mais ne possède pas d'activité kinase intrinsèque (**Figure 22**) (pour revue : (Israël, 2010)). Le domaine d'interaction entre les sous-unités kinase et NEMO est une séquence dans la partie carboxy-terminal (NBD : *NEMO binding domain*) de IKK α et IKK β (May et al., 2000).

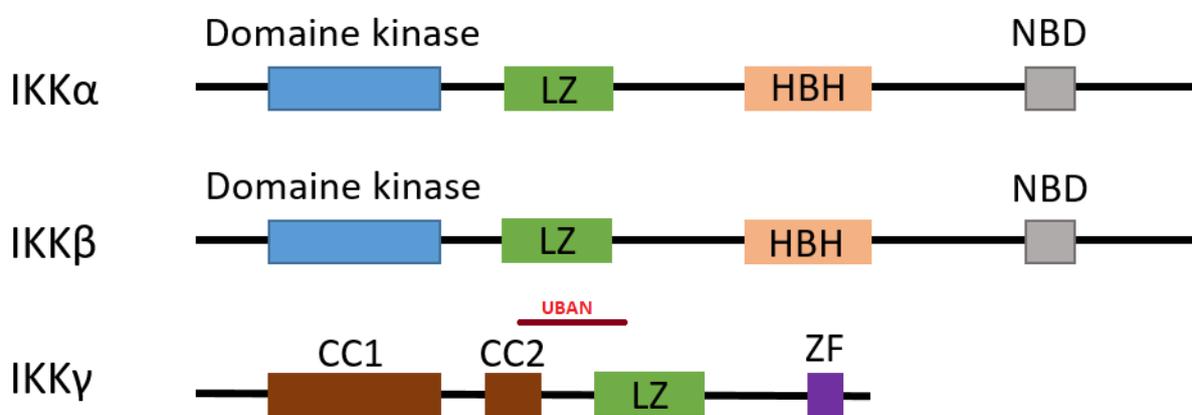


Figure 22 : Représentation schématique des sous-unités du complexe IKK (I κ B kinase). Les kinases IKK α et IKK β interagissent avec le premier domaine coiled-coil (CC1) de NEMO (NF- κ B Essential Modulator) grâce à leur domaine NBD (Nemo Binding Domain). NEMO contient également un deuxième domaine coiled-coil (CC2), un domaine LZ (Leucine Zipper) et un domaine ZF (Zinc Finger). HBH : Hélice-boucle-Hélice.

L'activation du complexe IKK nécessite l'ubiquitination K63 et linéaire de NEMO. Ces deux types d'ubiquitination de la sous-unité régulatrice NEMO sont réalisés par respectivement une E3-ligase et le complexe LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly*

Complex). Ces deux modes d'ubiquitination coopèrent dans l'activation de la voie classique de NF- κ B (Hadian et al., 2011). Ces deux systèmes enzymatiques sont recrutés par le récepteur TNFR1 par exemple (**Figure 23**) (Haas et al., 2009; Lo et al., 2009; Rahighi et al., 2009). Lors de la liaison du TNF- α , le TNFR1 se trimérise favorisant ainsi le recrutement de TRADD (*Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein*). Avec TRADD, il y a recrutement de RIP1 (*receptor-interacting 1*), BIRC2 et 3 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 3*) (c-IAP1 et 2) et TRAF2 et 5 (*TNF receptor associated factor*). RIP1 est rapidement ubiquitinée K63 par TRAF2 et 5 et par BIRC2 et 3, et recrute alors NEMO. Les protéines TAB2 et 3 (*TGF-beta activated kinase 1*) du complexe kinase TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) se lient à la chaîne d'ubiquitines de RIP1, et permet ainsi le recrutement de TAK1. Cette oligomérisation permet l'activation de TAK1 par autophosphorylation (pour revue : (Wertz and Dixit, 2010)). NEMO ubiquitiné permet le recrutement des sous-unités catalytiques IKK α et IKK β . Suite à ce recrutement, IKK α et IKK β contenant des sites spécifiques, dont la phosphorylation induit un changement conformationnel permettant leur activation, sont phosphorylées par TAK1 (Johnson et al., 1996).

Le complexe IKK, alors activé, phosphoryle alors la protéine inhibitrice I κ B α sur les sérines 32 et 36. Ces phosphorylations entraînent alors une ubiquitination K48 et la dégradation par le protéasome (Karin and Ben-Neriah, 2000). Les complexes NF- κ B n'étant plus retenus dans le cytoplasme peuvent jouer leur rôle de facteurs de transcription dans le noyau.



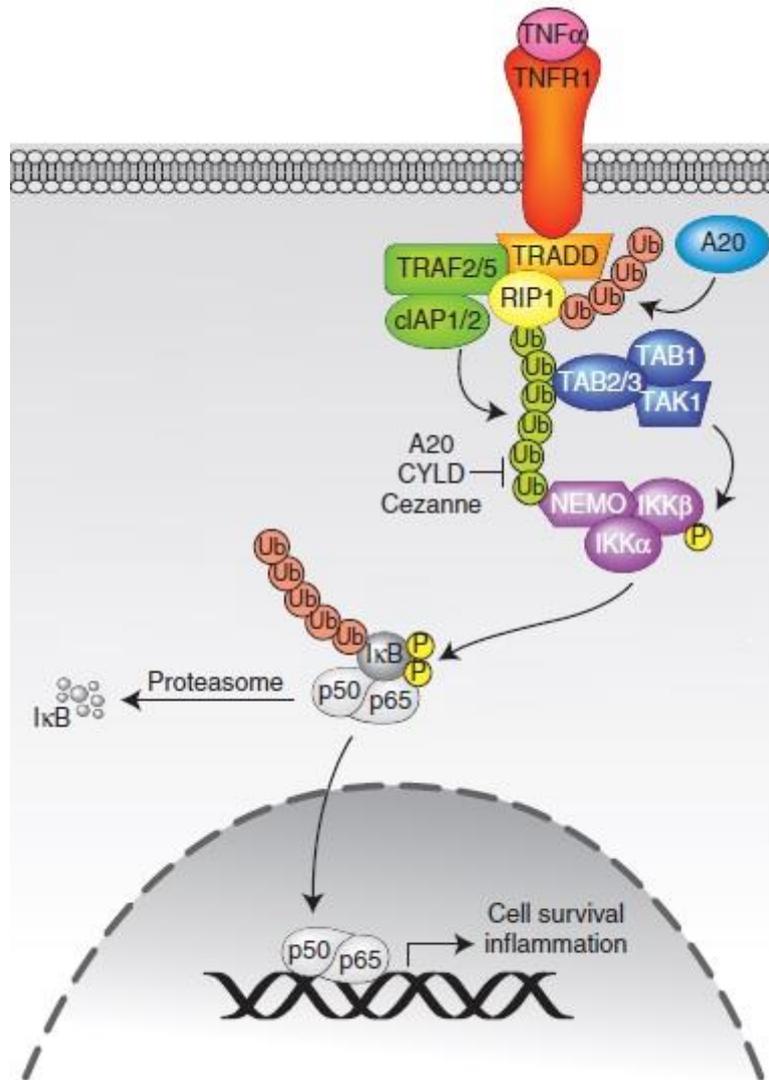


Figure 23 : Représentation schématique de la voies de signalisation TNFR1. Les chaînes d'ubiquitine liées à Lys-48 sont représentées en rouge, et les chaînes d'ubiquitine liées à Lys-63 sont représentées en vert (modifiée à partir de (Wertz and Dixit, 2010)).

Parmi les récepteurs activateurs de la voie classique de NF-κB, deux sont importants dans les lymphomes B, les TLRs et le BCR. La stimulation des TLRs permet le recrutement de MYD88 et favorise l'assemblage d'un complexe de signalisation comprenant IRAK1 et 4 (*Interleukin-1 Receptor Associated Kinase*) et TRAF6. TRAF6 est polyubiquitiné K63. IRAK4 phosphoryle IRAK1, qui favorise la dissociation d'IRAK1 et sa liaison à TRAF6. Le complexe IRAK1/TRAF6 s'associe ensuite avec le complexe TAK1/TAB2/3, via la liaison TAB2/3 aux chaînes de polyubiquitination K63 de TRAF6. S'en suit l'activation de TAK1 (pour revue : (Wertz and Dixit, 2010)). Parmi la famille des TLRs, un seul n'utilise pas MYD88 pour sa signalisation, le TLR3. Le TLR3 recrute la protéine TRIF (*Toll-Like Receptor Adaptor Molecule*) (Yamamoto et al., 2003). L'activation de NF-κB par TRIF est initiée par deux régions distinctes. TRIF se lie

directement à TRAF6 *via* des motifs de liaison à TRAF6 dans sa région N-terminale (Jiang et al., 2004; Sato et al., 2003). TRIF se lie également à RIP1 sur sa partie C-terminale (Meylan et al., 2004). RIP1 est polyubiquité pour former un complexe avec TRAF6 et TAK1, entraînant une activation NF- κ B d'une manière similaire à celle dans la voie dépendante de MYD88 (Sato et al., 2005).

L'agrégation du BCR induite par l'antigène conduit à la phosphorylation des motifs ITAM (*Immune Tyrosine Activating Motif*) de CD79A et B par LYN. Cette phosphorylation crée des sites d'accueil pour des protéines tyrosines kinases telles que SYK (*spleen tyrosine kinase*) et le recrutement de plus de LYN. BTK (*Bruton tyrosine kinase*) est recrutée au récepteur et avec SYK, ils activent PKC β (*Protein kinase C β*). PKC β active à son tour le complexe CBM composé de CARD11 ou (CARMA1) (*Caspase Recruitment Domain-containing protein 11*), BCL10 et MALT1 (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation 1*). MALT1 recrute TRAF6 qui polyubiquité NEMO et permet le recrutement de TAK1 pour phosphoryler IKK β (Lin and Wang, 2004; Seda and Mraz, 2015). Il est à noter que CARD11 est également capable d'activer la voie JNK. En effet, CARD11 régule l'activation de JNK2 grâce à BCL10 (Blonska and Lin, 2009).

I.2.3.2. La voie d'activation alterne.

La voie d'activation alternative est induite par différents membres de la superfamille du TNF comme le CD40 ligand, le facteur BAFF (*B cell Activating Factor*) et la lymphotoxine Béta (LT β) (Claudio et al., 2002; Saito et al., 2003; Senftleben et al., 2001) (**Figure 24**). En prenant comme modèle CD40, la kinase NIK est associée aux protéines TRAF3, TRAF2 et aux protéines BIRC2 et 3 dans le cytoplasme. La signalisation de la voie alternative de NF- κ B est régulée par NIK (*NF- κ B Inducing Kinase*). La protéine NIK est une kinase en amont du signalosome. NIK a d'abord été identifiée par son association à TRAF2 (Malinin et al., 1997) et sa capacité à activer NF- κ B quand elle est surexprimée (Ling et al., 1998; Malinin et al., 1997). NIK est constamment dégradée dans les cellules au repos par un complexe E3 ligase composé de TRAF 2 et 3 et les ligases E3 BIRC2 et 3. En réponse à l'activation du CD40, TRAF3 sert d'adaptateur pour recruter au récepteur NIK, TRAF2 et BIRC2 et 3. TRAF2 modifie alors BIRC2 et 3 avec une polyubiquitination K63, améliorant ainsi la capacité de BIRC2 et 3 à catalyser la polyubiquitination K48 de TRAF3. La dégradation TRAF3 par le protéasome dissocie NIK de BIRC2 et 3, permettant ainsi l'accumulation de NIK (pour revue : (Wertz and Dixit, 2010)).

L'augmentation du niveau de NIK catalyse la phosphorylation de IKK α sur la sérine 176, qui phosphoryle à son tour RelB/p100 (Ling et al., 1998; Woronicz et al., 1997). La protéine p100 est alors ubiquitinée K48 sur sa partie C-terminale pour la marquer comme cible du protéasome. La libération du dimère RelB/p52 permet sa translocation vers le noyau. La signalisation de la voie alternative de NF- κ B est lente et induit une réponse transcriptionnelle soutenue (pour revue : (Zhang et al., 2017)).

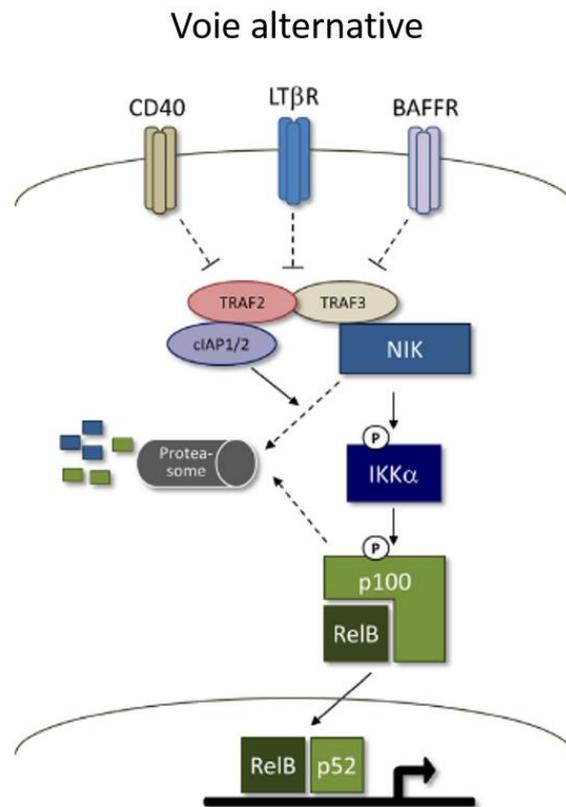


Figure 24 : La voie de signalisation alternative de NF- κ B. La signalisation de la voie alternative de NF κ B est régulée par NIK, qui est constamment dégradée dans les cellules au repos par un complexe E3 ligase composé de TRAF3/TRAF2 et les ligases E3 c-IAP1/2. L'activation d'un certain sous-type de la famille des TNFR comme LT β R, CD40 et BAFFR conduit à la stabilisation de NIK par l'inactivation du complexe TRAF/c-IAP. Le niveau de NIK augmentée catalyse la phosphorylation de IKK α , qui phosphoryle à son tour NF- κ B2/p100 pour le marquer comme cible du protéasome. La libération du dimère p52/RelB permet sa translocation vers le noyau. La signalisation de la voie alternative de NF- κ B est lente et induit une réponse transcriptionnelle soutenue (modifié à partir de : (Krappmann and Vincendeau, 2016)).



I.2.3.3. L'activation de NF- κ B par LMP1.

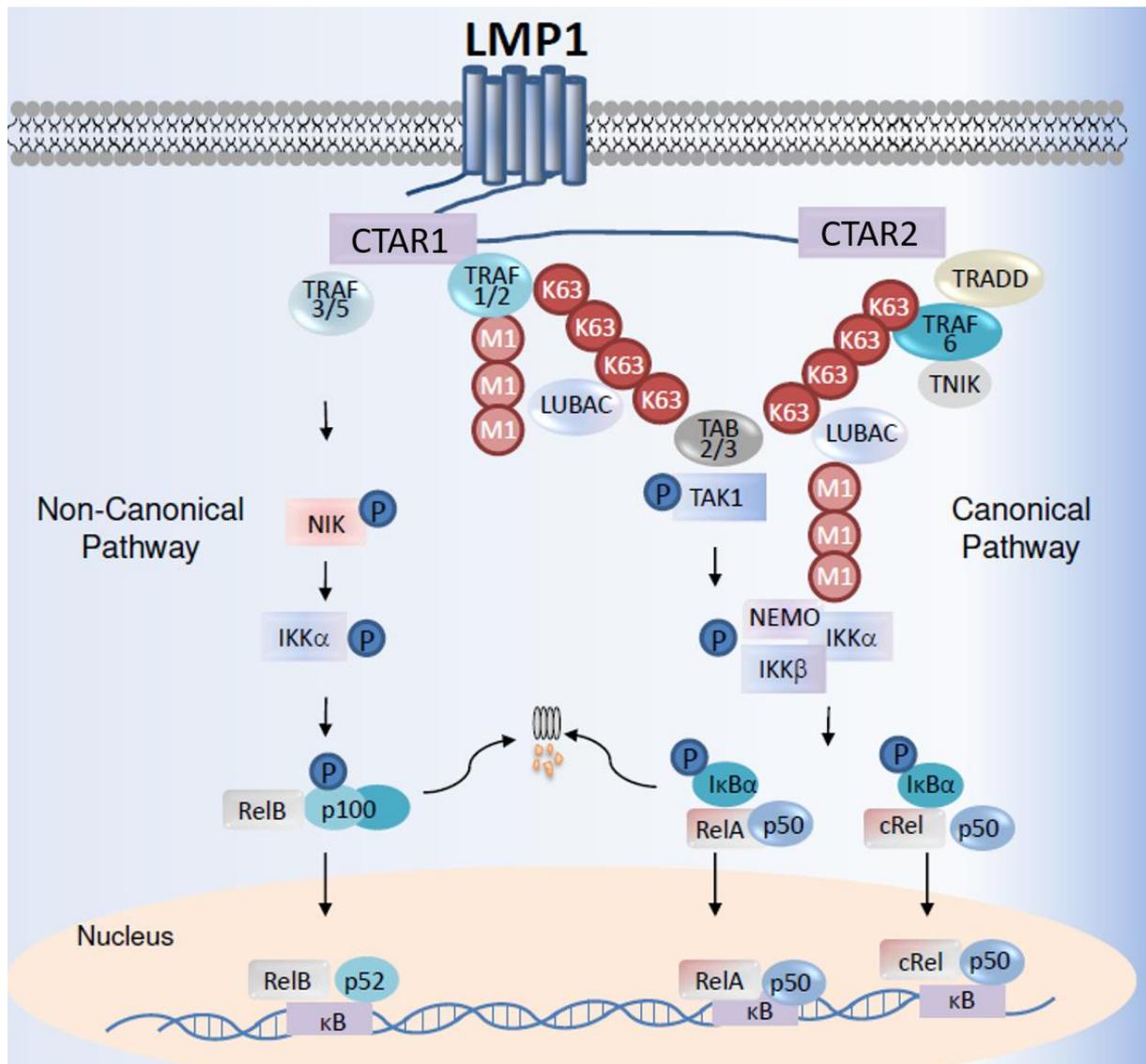


Figure 25 : Les voies d'activation classique et alterne de NF- κ B médiées par LMP1. Les domaines CTAR1 et CTAR2 recrutent des protéines adaptatrices. CTAR1 séquestre TRAF3 suffisamment loin de BIRC2/3 afin d'éviter la polyubiquitination K48 de NIK et sa dégradation. CTAR2 recrute TRADD et RIP1 pour permettre liaison à TRAF6. TRAF6 s'auto-ubiquine K63 pour permettre le recrutement de TAB2/3 / TAK1 (Wang et al., 2017).

La protéine LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*) du virus d'Epstein-Barr (EBV) est exprimée dans les lymphomes B associés à une immunosuppression (cf I.2.6.1.1). LMP1 est considérée comme la protéine transformante de l'EBV. LMP1, agrégée dans les radeaux lipidiques, induit des voies de prolifération, de survie, de migration et d'évasion immunitaire. Les domaines transmembranaires induisent le regroupement de plusieurs LMP1 pour activer la signalisation. Cette activation se fait à partir de la partie C-terminale cytoplasmique. Deux domaines C-terminaux permettent l'activation de la signalisation, CTAR (*C-terminal Activation*

Region) 1 et 2 (**Figure 25**). Ces deux régions permettent de mimer un signal CD40, un membre de la famille des récepteurs TNF et un récepteur clé de co-stimulation de la cellule B (*cf* 1.2.3.2) (Gires et al., 1997; Mosialos et al., 1995). Un modèle murin exprimant une protéine chimérique CD40-LMP1 permet ainsi un signal LMP1. Ce signal est induit par le CD40L (ligand). Dans ce modèle, la signalisation LMP1 remplace complètement la signalisation CD40 dans les cellules B, ce qui conduit à un développement normal des cellules B, à une activation, à une réponse immunitaire, à la formation de centres germinatifs et à l'hypermutation somatique *in vivo*. La seule différence entre les souris sauvages et ces souris exprimant CD40-LMP1 est une augmentation d'environ 2 fois des pourcentages de cellules B des centres germinatifs et de cellules plasmatiques ainsi qu'une quantité élevée d'Ig après immunisation. *In vitro*, la protéine chimérique induit la commutation de classe vers IgG1 de façon indépendante des cytokines (Rastelli et al., 2008).

La voie d'activation classique de NF- κ B est induite par le domaine CTAR2 de LMP1. Ce domaine recrute les protéines TRADD et RIP1 (Izumi and Kieff, 1997). La liaison avec ces protéines adaptatrices permet le recrutement des molécules TRAF6 (Wu et al., 2006). L'auto ubiquitination K63 de TRAF6 permet le recrutement de TAK1 et de NEMO. Ainsi TAK1 phosphoryle IKK β (pour revue : (Ersing et al., 2013)).

LMP1 active aussi la voie alterne de NF- κ B par un mécanisme incomplètement compris. Pour initier la signalisation, LMP1 recrute les protéines TRAF1, 2 3 et 5 *via* son domaine CTAR1 (Devergne et al., 1996). Cependant, contrairement à la signalisation par le récepteur CD40, CTAR1 n'a pas été observé pour déclencher la dégradation de TRAF3 (Brown et al., 2001; Xie et al., 2004). LMP1 séquestrerait suffisamment TRAF3 loin du complexe TRAF2/BIRC2/3 pour permettre à NIK d'échapper à la dégradation (de Jong et al., 2013). En ce sens, les données du laboratoire suggèrent que l'activation de RelB par LMP1 est bien moins forte que par le CD40 (Chanut et al., 2014).

1.2.4. Points de rétrocontrôle négatif.

1.2.4.1. p100, p105, et les protéines I κ Bs.

Parmi les cibles de NF- κ B, on peut retrouver différents gènes codant des protéines impliquées dans la régulation de cette voie. Parmi ceux-ci nous pouvons trouver :

- le gène *NFKBIA* codant I κ B α (Haskill et al., 1991; Sun et al., 1993)



- le gène *NFKBIE* codant IκBε (Tian et al., 2005)
- le gène *NFKB1* codant p105 (Ten et al., 1992)
- le gène *NFKB2* codant p100 (Lombardi et al., 1995)

Ainsi, NF-κB, en contrôlant l'expression de ses propres protéines inhibitrices, crée sa propre boucle de rétrocontrôle négatif.

I.2.4.2. La protéine A20.

La protéine A20 est une protéine cytoplasmique contenant des domaines à doigt de zinc codée par le gène *tnfaip3* (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) (Dixit et al., 1990). Cette protéine a été initialement identifiée comme un régulateur clé des voies de signalisation de l'inflammation puis un régulateur négatif de NF-κB (Opipari et al., 1992; Tewari et al., 1995). Dans la plupart des cellules, l'expression basale d'A20 est très faible, mais sa transcription est rapidement induite lors de l'activation NF-κB. Une fois exprimée, A20 fonctionne comme un régulateur de rétroaction négative de l'activation NF-κB (pour revue : (Coornaert et al., 2009)).

Le mécanisme moléculaire responsable de la fonction inhibitrice de NF-κB a été clarifié par l'élucidation du rôle d'A20. A20 possède deux fonctions: une activité d'enzyme désubiquitinante médiée par son domaine N-terminal OTU (*Ovarian Tumor*) et une activité d'ubiquitine ligase E3 médiée par sa structure en doigt de zinc (ZF) en C-terminal (Wertz et al., 2004). A20 permet le retrait des chaînes de polyubiquitine K63 de protéines de la signalisation NF-κB. Parmi elles, on retrouve des protéines de la famille TRAF, de la famille RIP ou encore de la sous-unité régulatrice de complexe IKK : NEMO. La désubiquitination K63 de RIP1 et TRAF6 permet l'inhibition de la voie NF-κB. L'activité ubiquitine ligase E3 d'A20 entraîne la polyubiquitination K48 de la protéine adaptatrice RIP1 conduisant à sa dégradation par le protéasome (Bertrand et al., 2008; Newton et al., 2008; Wertz et al., 2004).

A20 inhibe aussi de façon non catalytique la signalisation NF-κB induite par TNF et LUBAC en se liant à des chaînes linéaires de polyubiquitine *via* un de ses motifs ZF, ce qui empêche l'interaction induite par le TNF entre LUBAC et NEMO. Ce blocage est suffisant pour bloquer la phosphorylation de d'IKK par sa kinase TAK1 (Skaug et al., 2011; Verhelst et al., 2012).



I.2.4.3. La protéine CYLD.

La protéine CYLD (*Cylindromatosis*) est un suppresseur de tumeur fréquemment mutée dans la cylindromatose (maladie cutanée rare caractérisée par des tumeurs sur les glandes salivaires, dans le cuir chevelu ou encore sous cutanées). La suppression ou la mutation de CYLD favorise le développement tumoral (carcinome hépatocellulaire, cancer de la prostate) (Mathis et al., 2015). La déficience de CYLD conduit à une activation constitutive de NF- κ B entraînant une expression génétique pro-inflammatoire (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). La partie N-terminale de CYLD comprend trois domaines riches en glycine associés au cytosquelette (CAP-Gly). Les deux premiers liés aux microtubules, tandis que le troisième domaine se lie à NEMO. CYLD contient en outre deux motifs conservés riches en proline (PR), qui peuvent interagir avec les domaines SH3 dans d'autres protéines, et un motif de liaison au TRAF2. La partie C-terminale de CYLD contient un domaine catalytique de désubiquitination (Ritorto et al., 2014; Saito et al., 2004).

CYLD inhibe IKK et NF- κ B en éliminant les chaînes de polyubiquitine liées à K63 de TRAF2, TRAF6 et NEMO (Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). CYLD peut également se lier à et désubiquitiner BCL3, empêchant ainsi l'accumulation nucléaire de BCL3. Cela empêche l'activation des homodimères p50/p50 ou p52/p52 par BCL3 (Massoumi et al., 2006).

I.2.5. Fonctions biologiques de NF- κ B.

NF- κ B induit une grande variété de gènes qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires.

NF- κ B intervient notamment dans la prolifération, en régulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que les cyclines D1 (Guttridge et al., 1999) et D2 et CDK6 (Iwanaga et al., 2008). NF- κ B induit l'expression du proto-oncogène *c-myc*, facteur maître de la prolifération (Duyao et al., 1992b).

NF- κ B est également impliqué dans le phénomène d'apoptose. En effet, il induit l'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, A20, Bcl-XL, les protéines BIRCs, c-FLIP) (Catz and Johnson, 2001; Krikos et al., 1992; Stehlik et al., 1998). L'induction de ces protéines est impliquée dans les phénomènes de résistance aux chimiothérapies observées dans certains cancers (Dai et al., 2009). NF- κ B a également un rôle pro-apoptotique en stimulant



l'expression du récepteur de mort Fas (CD95) (Le Clorennec et al., 2008), PUMA (Wang et al., 2009) ou encore Bax (Shou et al., 2002).

NF- κ B régule les gènes de réponse immune en modulant l'expression de gènes majeurs de l'inflammation tels que le TNF- α et des interleukines (IL-1, IL-6, IL-8) (pour revue : (Hayden et al., 2006; Hoesel and Schmid, 2013).

Des facteurs angiogéniques sont également des cibles de NF- κ B comme par exemple le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Chilov et al., 1997). NF- κ B joue un rôle dans le phénomène d'invasion et de métastase en induisant notamment l'expression des protéines qui vont permettre le remodelage de la matrice extracellulaire : MMP-9 (*Matrix MetalloProteinase 9*) (Yan et al., 2004), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) (Iademarco et al., 1992) et ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule*) (van de Stolpe and van der Saag, 1996).

I.2.6. NF- κ B et lymphomagenèse B.

Les premières preuves d'une implication de NF- κ B dans les lymphomes humains proviennent de l'identification des réarrangements chromosomiques impliquant des membres de la famille NF- κ B (pour revue : (Luque and Gélinas, 1997; Mayo and Baldwin, 2000)). La translocation de *nfkb2* supprimant les répétitions ankyrines en C-terminal de la protéine et ainsi retirant la fonction inhibitrice de p100 a été trouvée dans des lymphomes B (Leucémie lymphoïde chronique) et le MM (Myélome multiple) (Fracchiolla et al., 1993; Neri et al., 1991). L'amplification du gène REL a également été fréquemment rapportée dans les lymphomes humains tels que les DLBCL et le lymphome de MALT (Gilmore et al., 2004). La protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr, qui est un analogue du CD40, induit l'activation de NF κ B (Laherty et al., 1992). Or les premières données obtenues *in vitro* avaient montré que LMP-1 est capable de transformer les fibroblastes Rat-1 (Wang et al., 1985) suggérant que l'activation de NF- κ B peut avoir un pouvoir transformant. Ces résultats ont suggéré une contribution importante de la dérégulation de l'activité de NF- κ B dans le développement de lymphomes.



I.2.6.1. NF-κB et lymphomes agressifs.

I.2.6.1.1. Lymphomes induits par l'EBV.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), un virus humain de la famille des *Gamma-Herpesviridae*, est répandu dans toute la population et est responsable d'une infection virale asymptomatique latente dans la grande majorité des individus. Pourtant, ce même agent possède une puissante capacité de transformation des lymphocytes et est étiologiquement lié à des lymphomes B malins : lymphome de Burkitt, DLBCL, les lymphomes B du sujet immunodéprimé après transplantation d'organe (PTLD, *Post-Transplant lymphoproliferative Disorder*) ou suite à l'infection par le VIH.

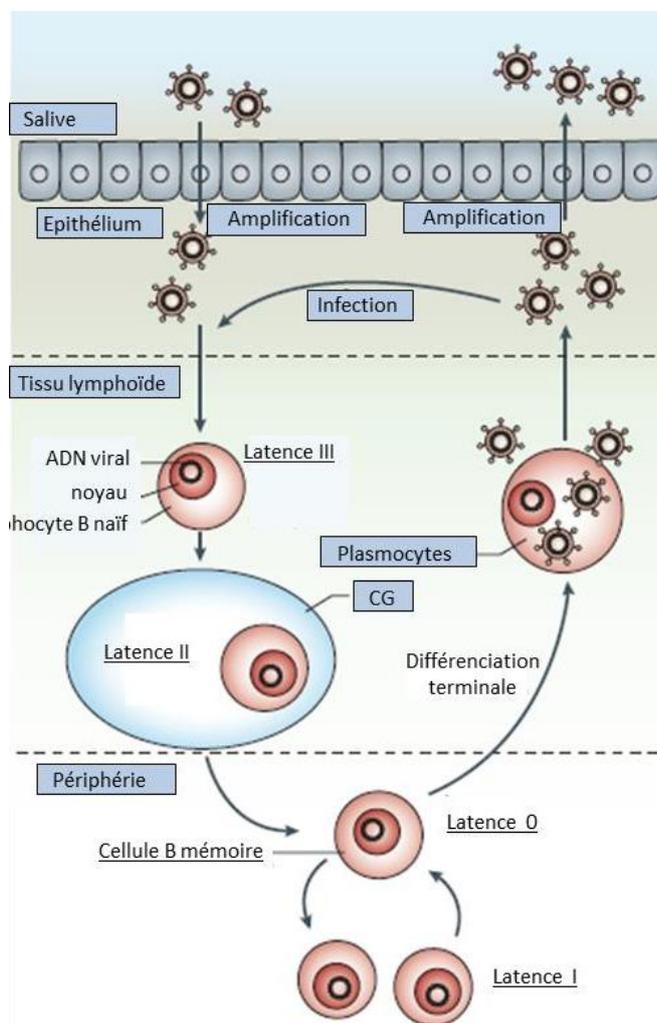


Figure 26 : Modèle de l'infection persistante des lymphocytes B par l'EBV. Lors de la primo-infection, le virion peut infecter directement ou indirectement les lymphocytes B. Les cellules B infectées expriment une latence de type III ce qui permet leur prolifération. Après un passage au travers des centres 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 et al., 2008)).
CG : centre germinatif

L'infection primaire se produit par voie orale et conduit à la réplication locale du virus dans l'oropharynx, impliquant une infection lytique de l'épithélium muqueux et des cellules B locales (**Figure 26**). Les cellules B expriment l'ensemble des protéines de l'EBV (latence III cf ci-après) permettant l'augmentation de la prolifération des cellules B dans les tissus

lymphoïdes pharyngés. Une réponse immunitaire primaire des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des antigènes de la latence III est déclenchée ainsi qu'une réaction NK non spécifique permettant la lyse d'une très grande majorité des cellules infectées par le virus. Les cellules B qui échappent à cette destruction, passent par les centres germinatifs déjà formés dans le tissu lymphoïde de l'oropharynx. A ce niveau, les lymphocytes B infectés expriment les protéines de la latence II (*cf* ci-après). Les cellules B infectées sortent du centre germinatif et évoluent vers un statut B mémoires en latence 0 dans le sang périphérique, elles ne sont alors plus reconnues par l'immunité cellulaire (Thorley-Lawson et al., 2013). Le plus fréquemment, la primo-infection se produit lors de l'enfance et elle est généralement asymptomatique. Chez l'adolescent ou le jeune adulte, elle peut provoquer la mononucléose infectieuse (MNI). La MNI est une pathologie lymphoproliférative bénigne. Elle est caractérisée par une asthénie majeure, par une angine et par une inflammation intense des ganglions. La MNI est en rapport avec une prolifération polyclonale des lymphocytes B qui induit une réponse immunologique exagérée (prolifération polyclonale des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK (*Natural Killer*)) responsable des symptômes observés (pour revue : (Young et al., 2016).

Soulignant l'importance d'une telle surveillance immunitaire, les personnes atteintes d'une déficience en cellules T profondes courent un risque élevé de développer une maladie lymphoproliférative B positive à l'EBV (B-LPD : *EBV-positive B-lymphoproliferative disease*). Ces B-LPD sont classiquement observées dans deux contextes d'immunodépression acquise:

- Chez les receveurs de cellules souches et de greffe d'organe solide au cours de la première année après la transplantation lorsque la fonction des lymphocytes T est la plus supprimée par les traitements immunosuppresseurs pour bloquer le rejet de greffe.
- Chez les patients infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) qui perdent presque toute la fonction des lymphocytes T à mesure qu'ils progressent vers le SIDA tardif.

La croissance des cellules B *in vivo* est directement liée à l'EBV. Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (LCL), qui surviennent lorsque l'EBV transforme et immortalise les cellules B *in vitro* via la protéine LMP1, est la contrepartie *in vitro* du B-LPD (Kaye et al., 1993; Pope et al., 1968). Ainsi, les cellules ont un phénotype lymphoblastoïde et expriment les 8 protéines de latence de l'EBV (les antigènes nucléaires EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C et –LP (*Epstein-Barr Nuclear*

Antigen) et les protéines de latence membranaires latentes LMP1 et 2 (*Latent Membran Protein*)): une forme d'infection appelée latence III ou programme de prolifération (Gottschalk et al., 2005).

Il existe différentes latences selon la combinaison de gènes exprimés par l'EBV (Young et al., 2016) :

- La latence de type I : caractérisée par l'expression uniquement de la protéine EBNA1, ce qui permet le maintien du génome viral dans la cellule.
- La latence de type II : caractérisée par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B.
- La latence de type III : caractérisée par l'expression du facteur de transcription EBNA-2 qui active l'expression de toutes les protéines de latence EBNA1, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3L, LMP1, LMP2A et LMP2B.
- La latence de type 0 n'est décrite qu'*in vivo* dans les lymphocytes B au repos circulants infectés.

Malgré sa forte antigénicité, l'EBV infecte avec succès et établit une infection persistante chez l'hôte. Cela reflète très probablement la capacité de certaines cellules B transformées *in vivo* à réprimer l'expression des antigènes viraux et à passer à un état de repos latent leur permettant d'échapper à la détection immunitaire (Thorley-Lawson et al., 2013). Le fait que toutes les sous populations de cellules B soient sensibles à une infection virale, mais que le réservoir de virus soit limité aux cellules B mémoires, suggère que les cellules B mémoires transformées par le virus passent par une réaction du centre germinale (GC) ou génèrent un environnement de type GC grâce aux protéines de latences (Thorley-Lawson et al., 2013). Les accidents génétiques découlant de ce processus normal contribuent à la pathogenèse des différents lymphomes B EBV positifs (Basso and Dalla-Favera, 2015).

Les PTLD surviennent chez des patients ayant subi une transplantation d'organe ou de moelle osseuse et soumis à un traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet de la greffe. L'incidence varie avec l'organe transplanté de 1% à 2% suite à une transplantation rénale jusqu'à 10% suite à une transplantation d'organe thoracique (en raison d'intensités différentes dans l'immunosuppression) (Tsao and Hsi, 2007). La présence de l'EBV en latence III est détectée dans les cellules B des patients souffrants de PTLD dans 100% des cas (Timms et al.,



2003). Les cellules expriment alors toutes LMP1 et ont donc une activation constitutive des voies d'activation classique et alterne de NF- κ B. Le profil d'expression de gènes des PTLD-EBV⁺ montre une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Craig et al., 2007). Parce que des troubles de l'inflammation et des cytokines similaires ont également été observés dans les DLBCL-EBV⁺, ces déséquilibres pourraient être des caractéristiques pathogènes moléculaires communes des troubles associés à l'EBV (Craig et al., 2007; Kato et al., 2014).

Parmi les lymphomes B agressifs EBV positifs du sujet immunocompétent, on retrouve les DLBCL et le lymphome de Burkitt. Ces tumeurs ont pour équivalent non tumoral des cellules B arrêtées à des étapes distinctes du développement B dans les GC (Lenz and Staudt, 2010).

10% des DLBCL de l'immunocompétent sont EBV⁺ et constituent un groupe particulier. Ces tumeurs sont situées dans le spectre des DLBCL de type ABC. Elles ont été initialement identifiées chez des patients âgés et désignées provisoirement comme DLBCL du sujet âgé positives pour l'EBV (Oyama et al., 2003; Shimoyama et al., 2008). Cependant, la maladie a ensuite été reclassée en tant que DLBCL-NOS (*not otherwise specified*) pour inclure les DLBCL EBV⁺ chez des patients immunocompétents plus jeunes (Cohen et al., 2013; Swerdlow et al., 2016). Les DLBCL du sujet âgé EBV⁺ sont supposés résulter d'une sénescence liée à l'âge quant à la surveillance spécifique de l'EBV par les cellules T (Cárdenas et al., 2015). En outre, ces tumeurs présentent généralement un profil d'expression génique de latence III, semblable à celui observé dans les lésions B-LPD apparaissant chez les receveurs de greffe immunosupprimés ou dans le SIDA tardif (Ok et al., 2013). Les DLBCL EBV⁺ ont un profil d'activation de NF- κ B plus prononcé par rapport à la majeure partie des DLBCL EBV⁻, avec une activation des voies classiques et alternes de NF- κ B (Chanut et al., 2014; Kato et al., 2014). L'activation de NF- κ B est le reflet de l'expression de LMP1, clairement exprimé dans ces lymphomes. L'étude du profil d'expression de gènes a permis d'identifier l'expression accrue des voies immunitaires et inflammatoires dans les tumeurs EBV⁺ (Kato et al., 2014). En plus des voies NF- κ B, le récepteur JAK/STAT, le récepteur NOD et les voies de signalisation des récepteurs TLRs sont également activés. En outre, l'infection *in vitro* par l'EBV des lignées cellulaires d'ABC DLBCL dérivées de patients ont confirmé l'activation accrue de NF- κ B et une phosphorylation accrue de STAT3 (Kato et al., 2014).

Comme d'écrit précédemment (*cf* : I.1.6.1), le lymphome de Burkitt (LB) est divisé en différentes formes cliniques. Celles-ci sont associées à l'EBV dans des proportions différentes : *i*) la forme endémique dans 95 à 100 % des cas, *ii*) la forme sporadique dans 10 à 20 % et *iii*) la forme associée à l'immunodéficience dans 50 % (Molyneux et al., 2012; Swerdlow et al., 2016). L'expression des gènes viraux dans les cellules de LB-EBV⁺ est restreinte à l'expression d'EBNA1 (latence 1) et sont donc LMP1 négatives. Comme ces produits géniques viraux en soi sont insuffisants pour induire la prolifération des cellules B, il est proposé que l'EBV ait d'autres rôles accessoires lors de la pathogenèse. L'EBV augmente la survie des cellules tumorales de LB après la translocation de *c-myc*, comme en témoigne la découverte originale selon laquelle les lignées de cellules de LB-EBV⁺ sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules de LB-EBV⁻ (Komano et al., 1998). Un scénario alternatif (mais pas mutuellement exclusif) est que l'EBV favorise la probabilité de la translocation de *c-myc* dans une cellule B du centre germinatif à la suite d'accidents lors des mutations des régions variables des gènes des Ig et/ou de la recombinaison de classe des Ig. Ceci est étayé par la découverte que la protéine AID (*activation-induced cytidine deaminase*), l'enzyme qui sert à la médiation de ces deux processus, favorise également la génération de la translocation de *c-myc* (Robbiani et al., 2008). En effet, l'infection par l'EBV induit une augmentation de l'activité d'AID (Epeldegui et al., 2007). Une étude récente conclut que cet effet est médié par EBNA3C (Kalchschmidt et al., 2016), un produit de gène viral qui n'est habituellement pas exprimé dans les tumeurs de LB. Une explication possible de ce paradoxe est que les premiers progéniteurs de LB ressemblent à des cellules lymphoblastoïdes B transformées par l'EBV (c'est-à-dire une infection en Latence III). Comme indiqué en section I.2.3.3, la protéine LMP1 exprimée en latence III induit également des signaux de survie *via* NF-κB (Cahir McFarland et al., 1999). La transition ultérieure vers un modèle de latence I observée dans la tumeur finale survient après la translocation de *c-myc* et acquisition de modifications génétiques supplémentaires (Allday, 2009; Thorley-Lawson and Allday, 2008).

I.2.6.1.2. Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) EBV⁻.

Comme décrit précédemment, les DLBCL sont classés en deux sous-types différents selon leur signature transcriptomique : GCB-DLBCL et ABC-DLBCL. Parmi ces deux sous-types, les ABC-DLBCL expriment très fortement les gènes cibles de NF-κB. Les patients atteints de DLBCL du type GCB ont une meilleure survie globale que ceux avec un DLBCL de type ABC. La

classification moléculaire des tumeurs sur la base de l'expression des gènes peut donc identifier des sous-types de cancer précédemment non détectés et cliniquement significatifs (Alizadeh et al., 2000).

Au regard de la similarité dans la signature génétique entre les cellules B activées par un antigène et les cellules tumorales des ABC-DLBCL, on peut supposer une dépendance des cellules tumorales à une activation constitutive de la voie canonique de NF- κ B (Davis et al., 2001). Les cellules tumorales d'ABC-DLBCL sont sensibles à l'inhibition de IKK β (Lam et al., 2005), ce qui indique l'importance de la voie canonique IKK/NF- κ B (**Figure 27**).

L'inactivation de *Tnfrif3*, codant la protéine A20, est retrouvée dans 24% des ABC-DLBCL. La conséquence courante de cette inactivation est la production de protéines A20 tronquées qui ne possèdent plus de domaines fonctionnels et sont soit instables soit fonctionnellement altérées (Compagno et al., 2009). Lorsqu'A20 sauvage est réexprimé, il entraîne une suppression de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose, accompagnées d'une régulation négative de l'activation NF- κ B (Kato et al., 2009). De plus, la protéine étant nécessaire à l'arrêt du signal des TLRs (Boone et al., 2004), son inactivation couplée à la mutation L265P de MYD88 induit une forte activation de NF- κ B et une forte prolifération (Wang et al., 2014a, 2014b).

L'activation constitutive du complexe protéique IKK dans les ABC-DLBCL peut être due à un signal chronique du BCR. Des mutations somatiques sur les médiateurs en aval du BCR conduisent à l'activation oncogénique de la voie canonique de NF- κ B. Les mutations de CD79A et CD79B permettent de rendre moins sensible la signalisation du BCR à la régulation négative de LYN (qui permet l'inhibition et l'internalisation du BCR) (Cornall et al., 1998; Ma et al., 2001). 20% des patients d'ABC-DLBCL présentent des mutations sur le motif ITAM des gènes du CD79A et surtout du CD79B (Davis et al., 2010).

10% des ABC-DLBCL présentent des mutations activatrices sur le gène *card11* (Lenz et al., 2008). La protéine CARD11 (*Caspase Recruitment Domain-containing protein 11*) est ainsi constitutivement active et insensible aux inhibitions des protéines en amont (SYK, BTK, PKC β) (Lamason et al., 2010; Naylor et al., 2011; Yang et al., 2012). Contrairement aux mutations sur CD79, le BCR n'a pas besoin d'être activé pour induire la croissance des cellules tumorales des ABC-DLBCL. Les mutations de CARD11 permettent le recrutement de BCL10 et MALT1 (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1*) indépendamment de

la stimulation du BCR (Lenz et al., 2008). Le CBM permet l'activation du complexe IKK et ainsi active la voie canonique de NF- κ B (Lin and Wang, 2004; Wegener and Krappmann, 2007; Wegener et al., 2006).

On retrouve également dans les ABC-DLBCL des mutations de l'adaptateur des récepteurs de l'immunité innée TLR (*Toll-Like Receptor*), la protéine MYD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) dans 38% des cas d'ABC-DLBCL (Ngo et al., 2011). 29% des cas d'ABC-DLBCL présentent la mutation L265P de MYD88. Cette mutation se trouve dans la séquence du gène codant le domaine TIR (*Toll Interleukin Receptor*) de MYD88, et permet d'augmenter l'interaction et l'activation de IRAK 4 et IRAK 1 (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*) (Ngo et al., 2011; Zhang et al., 2013a). 65% des cas présentant des mutations de MYD88 sont associés avec des mutations de CD79 ou CARD11, ce qui indique une coopération de ces 2 voies dans la survie des cellules tumorales (Ngo et al., 2011).

L'activation de NF- κ B dans les ABC-DLBCL peut également être due à l'auto-activation permanente du récepteur CD40 grâce à la production du ligand de ce récepteur par les cellules tumorales (Pham et al., 2002, 2005).

Des données plus récentes indiquent également une contribution de la voie alternative de NF- κ B dans les DLBCL. Une fraction importante des biopsies DLBCL présente un marquage positif en immunohistochimie pour p52 nucléaire (Compagno et al., 2009). Des délétions ou des mutations de TRAF3 ont été trouvés dans environ 15% des échantillons DLBCL et en conformité avec son rôle dans la régulation de la dégradation de NIK, sa modification améliore la voie alternative de NF- κ B (Zhang et al., 2015).



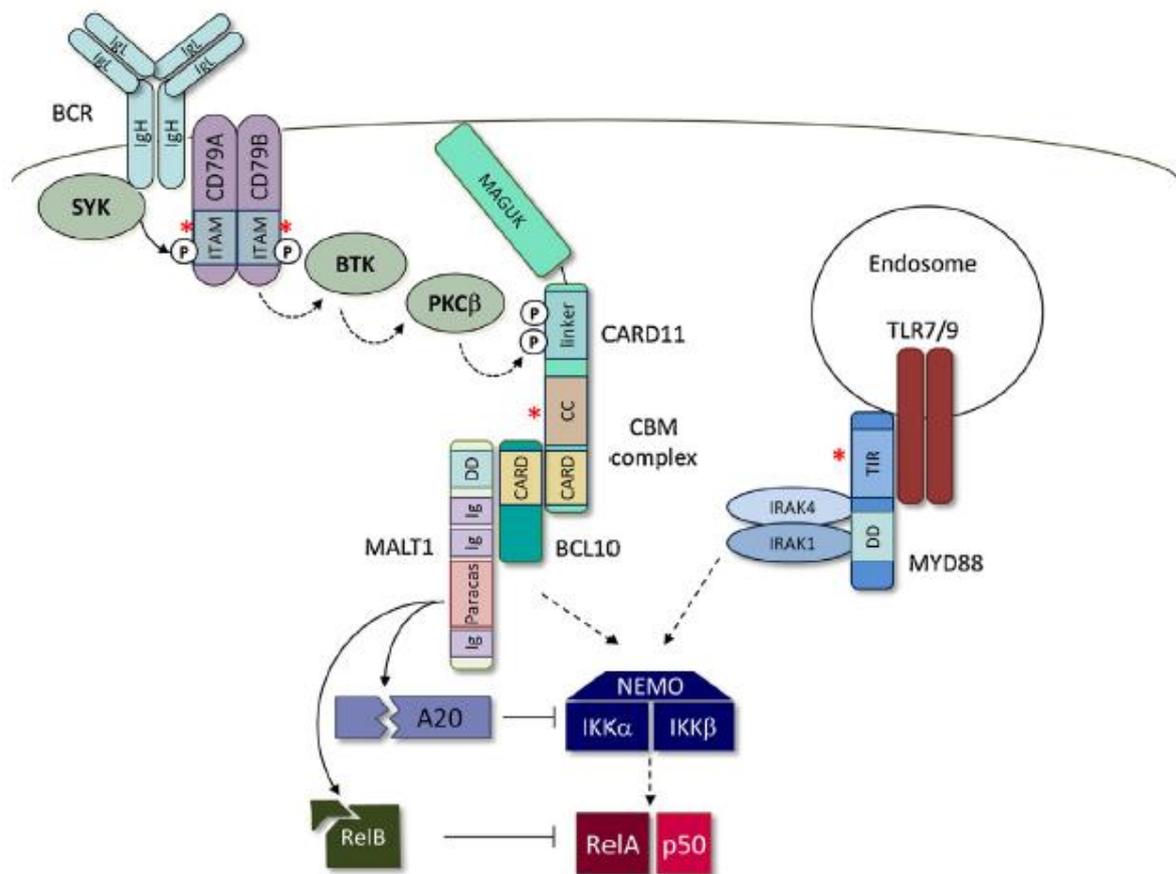


Figure 27 : Représentation schématique de la dérégulation du BCR et de MYD88 dans les ABC-DLBCL. (Krappmann and Vincendeau, 2016). La voie de survie NF- κ B est induite par des mutations oncogéniques récurrentes (étoiles rouges) dans les composants critiques des voies de signalisation du BCR et des TLR. Les mutations somatiques de type gain de fonction dans les adaptateurs CD79A et CD79B du BCR soutiennent la signalisation du BCR SYK dépendante et augmentent l'activation du complexe CBM via BTK et PKC β . Cependant, les mutants CD79 comptent encore sur un BCR fonctionnel. En revanche, les mutations de l'oncogène CARD11 déconnectent CARD11 des événements de signalisation en amont, et est donc résistant aux inhibiteurs de la signalisation BCR. Le complexe CBM permet l'activation de la voie classique IKK/NF- κ B. En outre, l'activité protéolytique de MALT1 est induite et conduit au clivage de substrats tels qu'A20 et RelB. Les mutations somatiques gain de fonction sont fréquentes dans MYD88, conduisant à l'activation constitutive du recrutement des protéines kinases IRAK4/IRAK1 et de l'activation de la voie classique de NF- κ B. Semblable à des mutations de CD79, les mutants de MYD88 comptent encore sur la signalisation des récepteurs endosomaux TLR7 et TLR9.

I.2.6.1.3. Lymphome de Burkitt EBV⁻.

Le lymphome de Burkitt et NF- κ B semblent incompatibles, une faible expression de NF κ B est une signature spécifique de ces lymphomes (Dave et al., 2006; Hummel et al., 2006). Cependant, le rôle de NF- κ B dans le lymphome de Burkitt reste flou. La répression de NF- κ B est impliquée dans la sensibilisation à l'apoptose induite par c-Myc (Ricci et al., 2004). NF- κ B

se fixe également sur des sites spécifiques des éléments régulateurs du gène des chaînes lourdes d'immunoglobuline et permet ainsi l'expression de c-Myc dans le lymphome de Burkitt (Kanda et al., 2000). Suite à ces observations, si la dérégulation de l'expression de c-Myc transloqué peut être induite par NF-κB et que l'échappement à l'apoptose est relié à NF-κB, NF-κB pourrait être activée dans le lymphome de Burkitt pour donner un avantage sélectif aux cellules. Une activation constitutive de NF-κB a été décrite dans certaines lignées cellulaires de lymphome de Burkitt et l'inhibition de NF-κB dans ces mêmes lignées conduit à une sensibilisation à l'apoptose induite par des cytokines ou des médicaments (Jazirehi et al., 2005; Piva et al., 2005; Rath and Aggarwal, 2001).

Une autre étude a montré l'inverse, NF-κB a été montrée comme toxique dans la lymphomagenèse c-Myc dépendant dans des lignées de lymphomes et dans le modèle murin Eμ (Klapproth et al., 2009).

NF-κB aurait donc un rôle ambivalent dans le lymphome de Burkitt, il est décrit à la fois comme inducteur de l'apoptose dans certains cas et dans d'autres cas il aurait l'effet inverse.

1.2.6.2. NF-κB et lymphomes indolents.

1.2.6.2.1. La maladie de Waldenström.

La maladie de Waldenström (MW) est une néoplasie indolente de cellules B matures rare (<5% des lymphomes non-hodgkinien) impliquant principalement la moelle osseuse. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la maladie comme un sous-type de lymphome lymphoplasmocytaire qui se caractérise par une population morphologiquement hétérogène de cellules B post centre germinatif, allant de petites cellules B matures à des cellules plasmiques complètement différenciées infiltrant la moelle osseuse. La MW est caractérisée par l'hypersécrétion d'une immunoglobuline monoclonale de type M (IgM) (Swerdlow et al., 2016).

Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans le développement de la MW et la présentation des symptômes associés. Des anomalies cytogénétiques fréquentes ont été signalées chez les patients MW : des délétions du bras q du chromosomes 6 dans 20 à 30% des patients, des délétions du bras q du chromosome 13 (13%), une trisomie 4 (8-18%) et des délétions du bras q du chromosome 11 (7%) (Mansoor et al., 2001; Nguyen-Khac et al., 2013; Schop et al., 2006; Terré et al., 2006). Des études de séquençage du génome entier ont



identifié des mutations clés associées à la MW. La mutation du gène de la protéine adaptatrice des récepteur TLR MYD88 a été trouvée dans 70 à 90% des patients atteints de MW (Rossi et al., 2013). Des altérations de CD79B (mutations) et LYN (délétions) sont présentes respectivement dans 8 à 15% et 70% des cas (Hunter et al., 2014). Le CD79B et LYN sont impliqués dans la régulation de la signalisation des récepteurs des cellules B (BCR), ce qui suggère que la signalisation BCR joue potentiellement un rôle important dans la MW. Les mutations CD79B et LYN sont presque toujours associées avec la mutation L265P de MYD88 dans la MW comme dans une proportion significative d'ABC-DLBCL. Plusieurs autres mutations telles que, TNFAIP3 (A20), TRAF2 et TRAF3 affectent la voie NF- κ B en aval de MYD88 (Hunter et al., 2014).

Le gène de la protéine CXCR4 est également retrouvé fréquemment muté, dans 30 à 40% des cas (Hunter et al., 2014). À la différence de MYD88, les mutants CXCR4 sont très variables et des mutations multiples de CXCR4 peuvent être présentes chez le même patient. La nature sous-clonale des mutations CXCR4 par rapport à MYD88 suggère que ces mutations sont acquises après MYD88, bien que cela puisse se produire au début de la pathogenèse de la MW (Schmidt et al., 2015; Xu et al., 2016). Cette mutation permet une activation constitutive des voies PI3kinase/AKT et MAPkinase/ERK1/2 et confère une résistance vis-à-vis de certains médicaments (Cao et al., 2015).

1.2.6.2.2. Leucémie lymphoïde chronique.

La leucémie lymphocytaire chronique (LLC) se caractérise par l'accumulation progressive de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. Au plan ontogénique, la LLC est divisée en 2 sous-groupes principaux basés sur la présence ou l'absence de mutations somatiques acquises dans le gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IGHV) exprimée par les cellules B leucémiques. Le premier est de bon pronostic et est associé à une maturation post-centre germinatif T-dépendant et le second est de plus mauvais pronostic et associé à une maturation T-indépendant (Chiorazzi et al., 2005).

Dans la leucémie lymphocytaire chronique, NF- κ B est activé dans pratiquement tous les cas (Herishanu et al., 2011). Des aberrations de la voie classique d'activation de NF- κ B sont retrouvées dans les LLC. Le gène d'I κ B ϵ est retrouvé muté dans 7 à 10% des cas de LLC. Cette

perte de fonction entraîne une diminution de l'inhibition de RelA ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation et de la translocation nucléaire de RelA (Damm et al., 2014; Mansouri et al., 2015). La translocation t(14;19) (q32;q13) qui juxtapose BCL3 à la fin du locus de l'IGH conduisant à une expression améliorée de BCL3 est retrouvée dans 2,6% des cas de LLC (Kelly et al., 2008). BCL3 activera alors la voie classique de NF- κ B (Chapiro et al., 2008).

Dans 2,5% des cas de LLC, BIRC3 est muté (Baliakas et al., 2015). Comme décrit dans la partie I.2.3.2, BIRC3 supprime l'activation constitutive de la voie de signalisation alterne de NF- κ B. Dans les LLC, les modifications de BIRC3 comprennent le plus souvent des mutations qui conduisent à une perte de l'activité E3 ubiquitine ligase et à l'activation constitutive de la voie alterne de NF- κ B (Baliakas et al., 2015; Cortese et al., 2014). La délétion du chromosome 11q, une aberration génomique récurrente qui se produit dans 18% des cas de LLC englobent le gène *birc3* dans la grande majorité des cas (Rose-Zerilli et al., 2014).

Lors de l'étude du séquençage du génome de plusieurs patients atteint de LLC, une mutation récurrente (L265P) dans le gène MYD88 a été identifiée chez 9 des 310 patients (2,9%) (Puente et al., 2011). Comme retrouvée dans les ABC-DLBCL ou encore la maladie de Waldenström, la mutation de MYD88 semble jouer un rôle dans la lymphomagenèse B des LLC (Landau et al., 2013; Puente et al., 2011). Dans les cellules LLC portant la mutation L265P, MYD88 co-immunoprécipite avec des quantités élevées d'IRAK1, une molécule effectrice importante pour l'activation de la voie classique de NF- κ B. En outre, d'autres molécules en aval le long de la voie NF- κ B, telles que STAT3 et I κ B α , montrent une phosphorylation accrue entraînant une augmentation de la liaison de NF- κ B à l'ADN (Puente et al., 2011).

Cependant les mutations de gènes impliqués dans l'activation de NF- κ B sont peu fréquentes. Les cellules B des LLC semblent surtout «dépendantes» du microenvironnement tumoral pour leur survie et leur prolifération qui est principalement médiée par l'interaction avec un certain nombre de récepteurs cellulaires (BCR, TLR ou CD40) qui activent aussi NF- κ B en aval. Par rapport aux cellules B normales, les cellules de LLC surexpriment et activent les kinases LYN et SYK intervenant dans la signalisation BCR (Buchner et al., 2009; Contri et al., 2005). L'expression de TLR dans les cellules B de LLC est assez hétérogène entre les patients, mais la plupart des cas expriment TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 sur la surface de la cellule et TLR7, TLR8, TLR9 dans les endosomes. Les cellules B de LLC stimulées par des ligands du TLR1/2/6, tels que des lipopeptides bactériens, activent la voie de signalisation de NF- κ B. Elles expriment

également des molécules d'activation (CD86 et CD25) et sont protégées de l'apoptose spontanée. Les cellules B de LLC ressemblent aux cellules B activées par l'antigène (Muzio et al., 2009). Dans les cellules B de LLC, l'interaction CD40/CD40L *in vitro* induit une augmentation de la survie médiée par une forte activité NF- κ B (Romano et al., 1998; Schattner, 2000).

I.2.6.2.3. Lymphomes de la zone marginale : lymphomes de MALT.

Les lymphomes de la zone marginale représentent 5 à 17% des lymphomes non-hodgkiniens. Ils sont divisés en 3 entités : les lymphomes du MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*) le plus fréquent (50-70%), les lymphomes spléniques de la zone marginale (20%) et les lymphomes de la zone marginale ganglionnaire (10%) (Swerdlow et al., 2016).

Les lymphomes de MALT sont des tumeurs indolentes de cellules B qui ont une prédilection pour les sites épithéliaux et se développent souvent dans un contexte d'inflammation chronique ou d'auto-immunité. Généralement, la tumeur se produit dans l'estomac, mais peut également se développer dans d'autres surfaces muqueuses, par exemple, le poumon et le foie. Le développement du lymphome de MALT gastrique provient initialement d'une infection persistante par *Helicobacter pylori*. Dans les premiers stades du lymphome de MALT gastrique, la prolifération des cellules B néoplasiques dépend d'un environnement inflammatoire qui est probablement conduit par des lymphocytes T stimulés par un antigène (pour revue : (Isaacson and Du, 2004)).

Les lymphomes de MALT sont souvent caractérisés par une forte activation de NF- κ B induite par trois translocations chromosomiques indépendantes impliquant les gènes BCL10, MALT1 et BIRC3 (ou cIAP2).



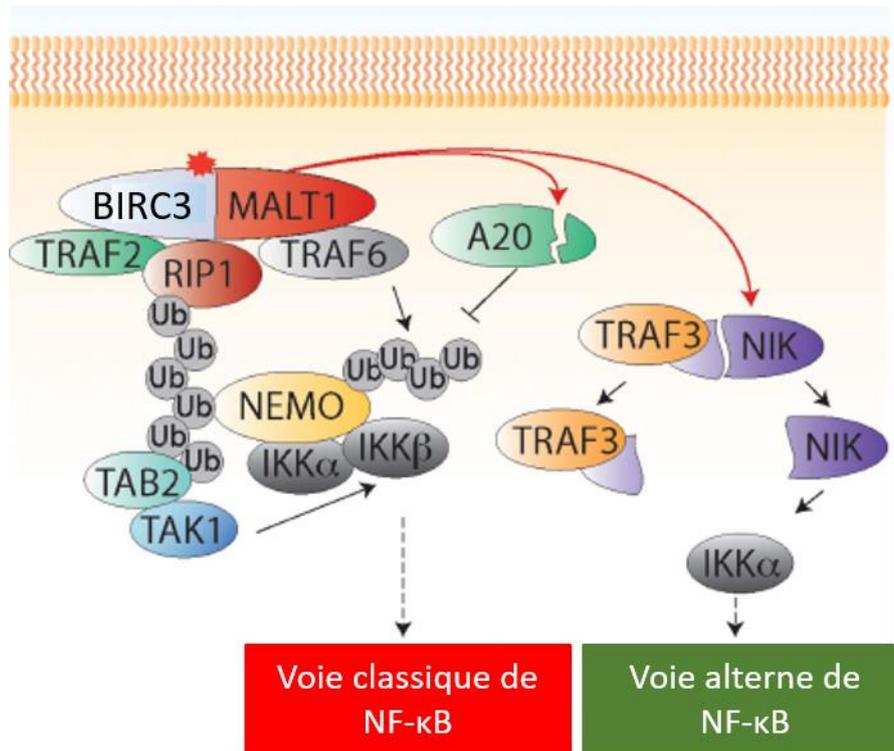


Figure 28 : Représentation schématique de la voie d'activation classique et alterne de NF- κ B par la protéine de fusion BIRC3-MALT1 dans le lymphome de MALT. La protéine de fusion promeut l'activation de la voie classique de NF- κ B via l'oligomérisation de RIP1 et TRAF2 dans la partie BIRC3 de la protéine de fusion. L'ubiquitination dépendante de TRAF2 de RIP1 recrute le complexe IKK. TRAF6 est recruté dans la partie MALT1 pour l'ubiquitination de NEMO. Le clivage d'A20 par MALT1 améliore l'activation de la voie classique de NF- κ B. En outre, le clivage de NIK par la paracaspase MALT1 entraîne l'activation constitutive de la voie alterne de NF- κ B. La partie C-terminale de NIK clivée est constitutivement active et phosphoryle IKK α et phosphoryle RelB/p100 (modifié à partir de (Nagel et al., 2014)).

La translocation t(11;18) (q21;q21) dans le lymphome de MALT localise le gène BIRC3 à proximité du gène MALT1, ce qui donne une protéine de fusion oncogénique (**Figure 28**). Cette protéine de fusion relie l'extrémité N-terminale de BIRC3 à l'extrémité C-terminale de MALT1 (Akagi et al., 1999; Ott et al., 1997). La translocation t(11;18) (q21;q21) est présente dans 16% des lymphomes de MALT (Ye et al., 2003). L'expression transgénique de la protéine de fusion BIRC3-MALT1 seule peut induire une expansion des cellules B de la zone marginale, mais elle n'est pas suffisante pour induire le développement de lymphomes à cellules B (*cf* ci-après) (Baens et al., 2006). BIRC3-MALT1 s'oligomérisent pour activer à la fois la voie de signalisation classique et alterne de NF- κ B de manière autonome des signaux en amont. L'oligomérisation de la protéine de fusion constitue une plate-forme pour le recrutement de facteurs de signalisation en aval. Alors que la partie BIRC3 s'associe à RIP1 et TRAF2, la partie MALT1 s'associe avec TRAF6 (Conze et al., 2010; Lucas et al., 2007). La protéine de fusion

BIRC3-MALT1 clive également la protéine A20 grâce à son activité paracaspase (Kato et al., 2009). Pour activer la voie alterne de NF- κ B, BIRC3-MALT1 clive NIK de façon à générer un fragment de NIK tronqué et stable qui agit comme une puissante oncoprotéine (Rosebeck et al., 2011).

La deuxième translocation chromosomique t(14;18) (q32;q21) est une aberration plus fréquente dans le lymphome MALT (18%) (Streubel et al., 2003). Il juxtapose le gène MALT1 à côté de l'amplificateur de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IGH-MALT1) conduisant à la surexpression de MALT1 (Sanchez-Izquierdo et al., 2003). En conséquence de la surexpression MALT1, la voie de signalisation classique de NF- κ B est augmentée (Ho et al., 2005).

La translocation t(1;14)(p22;q32), qui place le gène BCL10 sous le contrôle de l'amplificateur IGH, est une aberration génétique retrouvée dans 5% des lymphomes de MALT. Il favorise une surexpression et une localisation nucléaire de la protéine BCL10 (Willis et al., 1999; Ye et al., 2000). BCL10 fait partie du complexe CARMA1/CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) qui intervient dans l'activation d'IKK-NF- κ B lors de la liaison du BCR à l'antigène dans les cellules B (Thome et al., 2010).

Des mutations inactivatrices ou des délétions du gène *tnfaip3* (A20) sont retrouvées dans 12 à 37% des de lymphome de MALT selon l'organe (Kato et al., 2009; Novak et al., 2009). La méthylation du promoteur de *tnfaip3* est également modifiée dans les lymphomes de MALT, entraînant une régulation négative du gène (Chanudet et al., 2010).

1.2.6.2.4. Le lymphome de Hodgkin.

Avec un taux d'incidence annuel de près de 3 cas pour 100 000 personnes, le lymphome de Hodgkin (LH) est l'un des types de lymphome le plus fréquent (Morton et al., 2006). Sur la base de l'histologie et de l'immunohistochimie, deux sous-classes majeures peuvent être discriminées, à savoir le lymphome de Hodgkin classique (95%) et le lymphome hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire (5%) (Swerdlow et al., 2016). Le LH est un type inhabituel de malignité des lymphocytes B car seulement très peu de cellules (1%) représentent les cellules tumorales malignes des ganglions lymphatiques affectés. Dans le LH, les grandes cellules de Hodgkin (mononucléées) et les cellules de Reed Sternberg (HRS) (multinucléées) sont entourées de nombreuses cellules inflammatoires telles que les cellules B et T activées, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. L'identification des

réarrangements clonaux et des mutations somatiques dans les gènes de la chaîne légère et lourde des immunoglobulines (Ig) a clairement démontré l'origine B et la clonalité des cellules HRS. Les cellules tumorales proviennent des cellules B du centre germinatif (GC) qui ont acquis des mutations d'Ig défavorables ou une transcription d'Ig perdue pendant la réaction du GC (Bräuning et al., 2003; Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 2000). Des événements transformants supplémentaires au cours du développement du LH empêchent une sélection négative en altérant l'induction de l'apoptose dans ces cellules B. Conformément à ce modèle, les lignées cellulaires dérivées de lymphome de Hodgkin ainsi que les cellules HRS primaires présentent une activité constitutive élevée de IKK/NF- κ B, ce qui déclenche la survie et la croissance cellulaires en induisant un programme de gènes anti-apoptotiques et pro-prolifératifs (Bargou et al., 1996, 1997; Hinz et al., 2002; Krappmann et al., 1999). En outre, les cellules HRS ont en grande partie perdu leur phénotype de cellules B induisant la régulation négative de nombreux adaptateurs de la signalisation BCR (CD79A/B, Syk, Lyn, Blk) (Schwering et al., 2003).

Les causes de l'activité constitutive de NF- κ B n'ont pas encore été complètement résolues, mais l'activation des voies de signalisation classique et alterne de NF- κ B est augmentée dans les cellules HRS. Des mécanismes extrinsèques et intrinsèques aux cellules semblent contribuer à l'activation de NF- κ B dans les cellules tumorales. Les cellules HRS expriment plusieurs membres de la famille des TNFR à leur surface (RANK, CD30, CD40) (Aldinucci et al., 2016; Schmitz et al., 2009a). En outre, les cellules HRS elles-mêmes ainsi que les cellules inflammatoires environnantes produisent des quantités de ligands respectifs qui peuvent conduire à une stimulation chronique autocrine ou paracrine (Hinz et al., 2002; Krappmann et al., 1999). Comme NF- κ B lui-même contrôle l'expression de plusieurs de ces cytokines, l'activation constitutive de NF- κ B dans le LH peut au moins s'expliquer partiellement par ce cycle. En outre, les cellules HRS comportent plusieurs altérations somatiques qui conduisent à un gain ou une perte de fonction des régulateurs de NF- κ B. En conséquence, les voies classique et alterne de NF- κ B sont constitutivement activées dans les cellules HRS. Les gains du nombre de copies du locus REL se trouvent dans plus de 30% des LH (Barth et al., 2003; Joos et al., 2002; Martín-Subero et al., 2002). De plus, l'expression élevée du protooncogène BCL3 est une caractéristique commune des cellules HRS (Mathas et al., 2005). Les gains du nombre de copies BCL3 ou la juxtaposition de BCL3 au locus IGH ont été



signalés dans les cellules HRS (Martin-Subero et al., 2006; Mathas et al., 2005), mais il n'est pas clair si les translocations IGH contribuent réellement à la surexpression de BCL3, car la transcription d'Ig est habituellement réduite au silence dans les cellules HRS (Marafioti et al., 2000).

Outre ces événements d'activation, plusieurs régulateurs négatifs de la voie classique de NF- κ B sont fréquemment mutés dans le LH. Au total, 10 à 20% des cellules de LH primaire ont des mutations ponctuelles inactivant I κ B α et I κ B ϵ (Emmerich et al., 1999, 2003; Jungnickel et al., 2000). Le gène *tnfrsf10b* est muté dans 40% des LH (Kato et al., 2009; Schmitz et al., 2009b). Il est intéressant de noter qu'une lignée cellulaire HRS (L428) qui porte des mutations inactivatrices de I κ B α et I κ B ϵ est résistante à la surexpression d'A20, révélant que les mutations en aval rendent les cellules indépendantes des événements de signalisation en amont de NF- κ B (Schmitz et al., 2009b). Des mutations bialléliques ou monoalléliques du gène CYLD ont été rapportées dans les cellules HRS primaires (Schmidt et al., 2010). Les cellules HRS sont également caractérisées par des niveaux nucléaires élevés de p53 et de RelB, indiquant une signalisation alterne aberrante (Nonaka et al., 2005; Ranuncolo et al., 2012). Les gains de nombre de copies récurrentes dans le gène *map3k14* qui code NIK (35%) et les délétions monoalléliques de TRAF3 (15%), ont été trouvés dans le LH classique (Otto et al., 2012). En outre, la suppression de l'expression de RelA, c-Rel ou RelB est toxique pour les lignées de cellules HRS, ce qui suggère que l'activation parallèle des voies classique et alterne de NF- κ B est essentielle pour la survie des cellules de LH.

En Amérique du Nord et en Europe, 20-50% des LH classiques chez les patients immunocompétents et 90-100% chez les immunodéprimés sont infectés par l'EBV et l'infection est plus souvent observée chez les patients plus âgés (Kapatai and Murray, 2007). Les cellules HRS infectées par l'EBV expriment trois protéines virales, EBNA1, LMP1 et LMP2 (latence II). Bien que LMP1 soit exprimé chez les patients atteints de LH, il n'y a pas de corrélation claire entre l'expression et le pronostic (Mao et al., 2013). Les niveaux très élevés de LMP1 observés dans les cellules HRS semblent être essentiels dans la pathogenèse du LH. LMP1 active des voies de signalisation cellulaire dont NF- κ B, et induit des modifications transcriptionnelles dans les cellules B des centres germinatifs qui sont caractéristiques des cellules HRS (Vockerodt et al., 2008). Un autre rôle potentiel pour LMP1 peut impliquer la suppression du cycle lytique du virus qui pourrait conduire à la mort cellulaire. Dans les

modèles *in vitro*, le passage de la latence à la réplication du virus dans les cellules B infectées par l'EBV peut être déclenché par la différenciation des cellules plasmatiques ou l'activation de la signalisation BCR. Les données récentes suggèrent que LMP1 peut inhiber le premier en perturbant le programme de transcription de BLIMP1 nécessaire à la différenciation des cellules B terminales, alors que ce dernier peut être bloqué par la perte d'un BCR fonctionnel (Vrzalikova et al., 2011). La contribution de LMP2 dans les LH est moins bien comprise. La signalisation LMP2 peut fournir un signal de survie en engageant la voie PI3K dans les cellules HRS EBV⁺ (Vockerodt et al., 2013).

I.2.6.3. NF- κ B et Myélome multiple (MM).

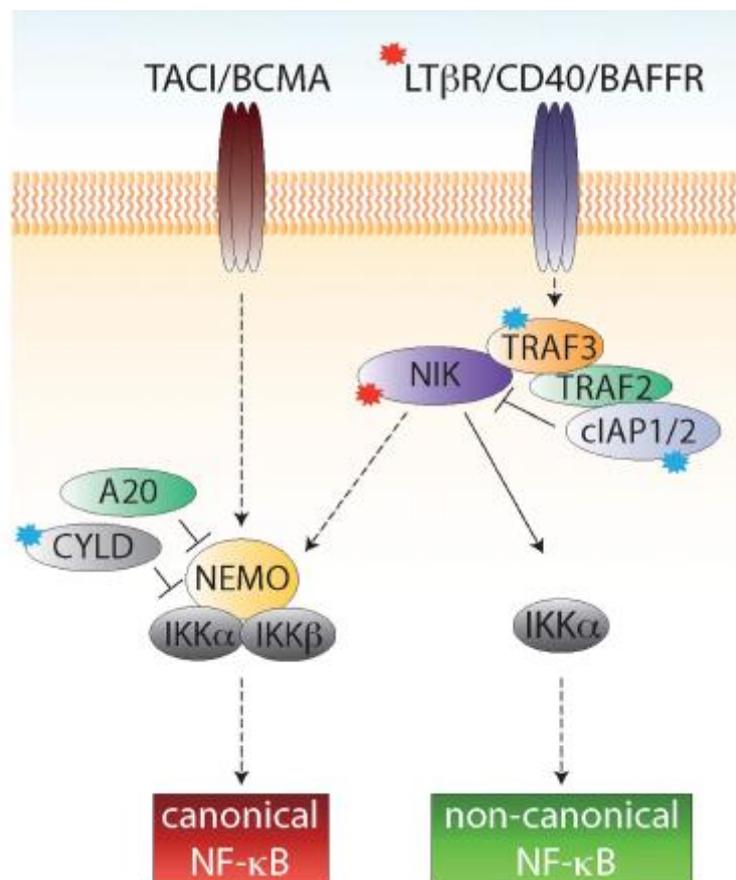


Figure 29 : Représentation schématique des modifications des voies d'activation de NF- κ B (modifié à partir de (Nagel et al., 2014)). Les astérisques rouges représentent les mutations activatrices et les bleus les mutations inhibitrices.

Le myélome multiple (MM) est une prolifération maligne d'un clone plasmocytaire à longue durée de vie produisant de manière inadaptée et exagérée une immunoglobuline ou l'un de ses fragments (*cf* I.1.6.3) (Dewald et al., 1985; Sawyer et al., 1995; Weh et al., 1993).

Les myélomes multiples présentent également des dérégulations de NF- κ B, à la fois sur la voie canonique et la voie non canonique (**Figure 29**). Cette activation constitutive de NF- κ B va contribuer à la survie et à la prolifération des cellules de MM. De fortes quantités nucléaires de la sous-unité RelA sont présentes dans 80% des biopsies de MM. Cette présence est corrélée avec une augmentation de l'expression des gènes cibles anti-apoptotiques de NF- κ B (Annunziata et al., 2007). On retrouve également une forte accumulation nucléaire de p52 et de RelB dans les cellules de MM. Par EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*), il a été montré que la fixation constitutive de RelB à l'ADN est retrouvée dans environ 40% des cas des MM, et aurait un effet pro-survie (Cormier et al., 2013).

Ces dérégulations peuvent être dues à des mutations sur des régulateurs positifs ou négatifs des voies de NF- κ B (9 à 17% des cas de MM) (Keats et al., 2012). La majorité des mutations sont associées à la voie non-canonique : NIK, les récepteurs CD40 et LT β R (*Lymphotoxin β Receptor*) vont avoir des mutations de type « gain de fonction ». Alors que TRAF2/3 (*TNF Receptor-Associated Factor*), cIAP1(BIRC2)/cIAP2(BIRC3) (*c-Inhibitors of Apoptosis Proteins*) et p100/p52 vont avoir des mutations de type « perte de fonction » (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2012; Migliazza et al., 1994). Dans 50% des cas de MM, il y a une délétion ou une inactivation du gène *traf3*. Dans la plupart de ces cas, la région de fixation de TRAF3 est délétée, ce qui empêche la fixation sur NIK et le recrutement de TRAF2 / BIRC2/3 E3 ligase, abrogeant ainsi la dégradation de NIK (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2012). D'autres altérations peuvent induire une augmentation de l'activité de NIK, comme l'amplification ou la translocation du locus NIK, l'inactivation de cIAP1/2 ou encore des mutations activatrices de LT β R (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2012). La surexpression de NIK peut activer la voie canonique de façon indirecte en promouvant l'activation de IKK β (Ramakrishnan et al., 2004).

Une faible proportion de mutation dans les MM affecte la voie classique de NF- κ B. La mutation du récepteur TACI (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*), un récepteur de la famille TNF, permet de l'activer. La mutation de CYLD permet la lever de l'inhibition de BCL3 et ainsi permet l'activation de p105/p50. La protéine p105/p50 est également retrouvée mutée (Annunziata et al., 2007).

L'abondance des mutations sur la voie non canonique montre le rôle prédominant de cette voie dans les MM. Néanmoins des études ont montré que l'inhibition de IKK β était



toxique pour les MM, donc la voie canonique joue également un rôle crucial dans la pathologie (Hideshima et al., 2006; Jourdan et al., 2007).

I.2.7. Modèles murins avec dérégulation de NF- κ B : impact sur la lymphomagenèse B.

Il existe différents types de modèles murins pour étudier l'implication de NF- κ B dans la lymphomagenèse. Ces modèles peuvent être des modèles présentant des activations ou des inactivations de la voie de signalisation de NF- κ B. Ces différents modèles vont permettre une meilleure compréhension du rôle de NF- κ B dans les mécanismes de lymphomagenèse B.

I.2.7.1. Modèles murins invalidés pour les sous-unités de NF- κ B.

L'inactivation du gène *nfkb1* codant la protéine p105/p50 (Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990) entraîne une diminution des cellules B dans la zone marginale et des cellules B péritonéales (Cariappa et al., 2000; Pohl et al., 2002). La prolifération BCR-dépendante est normale dans ces souris mais les cellules B ne prolifèrent pas après une stimulation du TLR4 (Sha et al., 1995). De plus, bien que le nombre de cellules B folliculaires soit normal dans les souris *nfkb1*^{-/-}, cette population de cellules B se renouvelle plus rapidement que chez les souris sauvages (Grumont et al., 1998). Cette constatation est cohérente avec un taux anormalement rapide de mort spontanée des cellules B *nfkb1*^{-/-}. Les cellules B ont également un blocage partiel du passage de la phase G1 à S dans le cycle cellulaire (Grumont et al., 1998).

Les souris déficientes pour le gène *nfkb2*, codant p100/p52 (Bours et al., 1990, 1992), montrent une réduction marquée du compartiment B dans la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. En outre, la rate et les ganglions lymphatiques des souris mutantes présentent une architecture altérée, caractérisée par des zones de cellules B diffuses et irrégulières et une absence de zones marginales et de manteau périfolliculaire. La formation de centres germinatifs secondaires dans la rate est également altérée. La prolifération des cellules B déficitaires en p100/p52 est modérément réduite en réponse au lipopolysaccharide et au CD40. Cependant la maturation des cellules B et la commutation de classe des immunoglobulines sont normales. Les souris mutantes pour *nfkb2* ont également une diminution des cellules B circulantes. (Caamaño et al., 1998; Franzoso et al., 1998). En outre, ces souris présentent une déficience dans l'expression de chimiokines indispensables dans l'organogenèse lymphoïde (Bonizzi et al., 2004; Poljak et al., 1999).



Dans les souris *c-rel*^{-/-} (Chen et al., 1983), les cellules B ne répondent plus au stimuli mitogéniques et ont une diminution de leur prolifération (Köntgen et al., 1995). Les cellules B des souris *c-rel*^{-/-} ont une diminution de la prolifération et un blocage de la transition G1/S du cycle cellulaire (Grumont et al., 1998). Bien que le développement précoce des lymphocytes B soit normal chez les souris *c-rel*^{-/-}, il y a moins de cellules B présentant un phénotype de B mémoire (IgM⁺/IgD⁺). Lors de l'immunisation, les souris *c-rel*^{-/-} génèrent moins de cellules B avec un phénotype de centre germinatif (Tumang et al., 1998).

L'absence de RelA (Schmid et al., 1991) chez les souris KO conduit à la mort embryonnaire des souris entre 15 à 16 jours du à la mort des hépatocytes fœtaux. La mort de ces hépatocytes fœtaux *rela*^{-/-} provient de leur sensibilité accrue aux effets cytotoxiques du TNF- α , comme en témoigne l'observation selon laquelle l'absence de cette cytokine sauve les souris *rela*^{-/-} de la létalité embryonnaire (Beg et al., 1995a; Doi et al., 1999). La génération de lymphocytes B fœtaux est drastiquement diminuée dans le foie fœtal (Prendes et al., 2003).

Les souris dépourvues de RelB (Ryseck et al., 1992), comme les souris *nfkb1*^{-/-} et *nfkb2*^{-/-}, présentent des défauts dans les structures des organes lymphoïdes secondaires. Les souris *relb*^{-/-} ne développent pas de plaques de Peyer et ne parviennent pas à former des centres germinatifs et de réseaux avec les cellules dendritiques en réponse à un antigène. La fonction de RelB dans les cellules dendritiques est également nécessaire pour l'activation des lymphocytes T (Zanetti et al., 2003). RelB est également impliqué dans l'organisation de la zone marginale (Weih et al., 2001; Yilmaz et al., 2003). Comme les défauts de l'organogenèse lymphoïde qui se produisent dans les souris *nfkb2*^{-/-}, ceux observés dans les souris *c-rel*^{-/-} sont associées à une déficience de l'expression de chimiokines dépendante de p52/RelB régulées par la signalisation LT β (Bonizzi et al., 2004).

Les modèles murins KO des sous-unités de NF- κ B ont permis de décrire les rôles *in vivo* des différentes sous-unités dans l'organogenèse, l'architecture des organes lymphoïdes ainsi que dans la prolifération et la survie des cellules B. RelA est particulièrement important dans la régulation de l'apoptose et RelB joue un rôle prépondérant dans la réponse immune en permettant l'activation des cellules T *via* les cellules dendritiques. Ces modèles murins ne développent pas de lymphomes B mais au contraire ont une diminution du compartiment B de façon directe ou à cause du microenvironnement. Cependant, NF- κ B a un rôle en faveur de la prolifération des cellules B.



I.2.7.2. Modèles murins de surexpression et de sur-activation des sous-unités NF-κB.

Un modèle murin affectant le gène *nfkb1* a été développé, dans ce modèle la partie C-terminale a été délétée ainsi la protéine a perdu ses répétitions ankyrine qui permettaient sa séquestration dans le cytoplasme en masquant la séquence de localisation nucléaire. Ce modèle *nfkb1^{ΔCT/ΔCT}* présente une splénomégalie, des gros ganglions et des infiltrations de cellules lymphoïdes dans divers organes. La prolifération des cellules B est augmentée *in vivo* et le nombre de cellules B dans la rate est augmenté. L'activité NF-κB est également accrue dans les cellules B de ce modèle (Ishikawa et al., 1998).

Sur le même principe, un modèle présentant la délétion de la partie C-terminale de p100 a permis d'observer une hyperkératinisation de la rate, une infiltration de cellules lymphoïdes dans divers organes et de gros ganglions (Ishikawa et al., 1997). Les hyperprolifération observées sont compatibles avec l'induction de dimères contenant p52 régulés par une multitude de ligands de la famille des TNFR (BAFF, RANK) (Beinke and Ley, 2004). Les tissus affectés des souris *nfkb2^{ΔCT/ΔCT}* n'expriment pas des niveaux de dimère p52 supérieurs à la normale mais ont une augmentation de l'expression de certains gènes connus comme cibles de la signalisation NF-κB. L'augmentation de la prolifération des cellules B chez les souris *nfkb2^{ΔCT/ΔCT}* souligne l'importance de la régulation de la prolifération cellulaire *via* les dimères p52 (Ishikawa et al., 1997). Le rôle de p52 dans la promotion de la prolifération cellulaire est en accord avec la découverte que certains lymphomes humains (MM et LLC) ont des altérations de gène *nfkb2* proches de la suppression de la partie C-terminale créée dans les souris *nfkb2^{ΔCT/ΔCT}* (pour revue : (Courtois and Gilmore, 2006)).

Un modèle de souris v-Rel place le gène *v-rel* sous le contrôle du promoteur murin proximal de *lck* permettant ainsi une expression spécifique dans les thymocytes (Allen et al., 1992). Ces souris décèdent avant 10 mois et développent des lymphomes et des leucémies T. Ces tumeurs sont constituées de cellules CD4⁺ CD8⁺ ou CD4⁻ CD8⁺. V-Rel induit la tumorigenèse en s'associant avec p50 ou en homodimère (Carrasco et al., 1996). Une autre étude de cette équipe a constitué en un croisement des souris v-Rel avec un autre modèle de souris sur-exprimant IκBα. Ces souris présentent une lymphomagenèse retardée (Carrasco et al., 1997). Ces résultats appuient la notion selon laquelle l'expression dérégulée de c-Rel est oncogénique. Pourtant, il s'est avéré difficile d'établir des modèles de souris dans lesquels c-Rel fonctionne comme un oncogène (pour revue : (Gilmore et al., 2004)). Il est à noter que la

génération de souris transgéniques avec *c-rel* sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules B n'a pu être réalisée, suggérant que la surexpression de c-Rel peut être toxique à certains stades du développement des cellules B (Gerondakis et al., 2006; Gilmore and Gerondakis, 2011).

Encore une fois, les modèles murins avec une activation constitutive de NF-κB (*nfkb1^{ΔCT/ΔCT}* et *nfkb2^{ΔCT/ΔCT}*) n'ont pas développé de lymphome B. Une activation seule des voies de signalisation de NF-κB ne suffit pas pour être oncogénique pour les cellules B.

I.2.7.3. Modèles murins invalidés pour les inhibiteurs de NF-κB.

I.2.7.3.1. Les inhibiteurs classiques.

Les souris *ikba^{-/-}* (Haskill et al., 1991), déficiente pour IκBα, ont un développement embryonnaire normal et meurent 7 à 10 jours après leur naissance dû à une dermatite inflammatoire généralisée et un compartiment granuleux amplifié (Beg et al., 1995b). Suite à une stimulation mitogénique, les cellules B de ces souris ont une prolifération augmentée (Chen et al., 2000).

Les souris *ikbe^{-/-}* (Whiteside et al., 1997) sont viables et ne présentent que quelques défauts du système immunitaire comme une augmentation de l'expression de certains isotypes d'immunoglobuline et de cytokines, cible ou non de RelA et c-Rel (Mémet et al., 1999). La régulation à la hausse d'autres membres IκB (α et β) masque les effets *in vivo* des souris *ikbe^{-/-}* et explique le phénotype peu changé des souris *ikbe^{-/-}*. La prolifération des cellules B n'est pas modifiée dans ce modèle (Mémet et al., 1999).

Le croisement entre ces deux modèles, *ikba^{-/-}* et *ikbe^{-/-}* conduit à une sévère perturbation du développement B. Ces souris meurent à la naissance par une détresse respiratoire et ont une augmentation de l'activité NF-κB. Les fœtus ont un défaut de développement des cellules B. Ceci est la conséquence d'une apoptose accrue des cellules B, en particulier les cellules B immatures B220⁺ IgM⁺ et les précurseurs de cellules B B220⁺ IgM⁻ (Goudeau et al., 2003).

I.2.7.3.2. BCL3.

L'architecture splénique des souris *bcl3^{-/-}* est altérée et la formation de centre germinatif diminue (Franzoso et al., 1997; Schwarz et al., 1997). Les souris *bcl3^{-/-}* ont une



réduction du nombre de cellules B dans leurs organes lymphoïdes secondaires. Cela s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules B folliculaires et de la perte de la population de macrophages dans la zone marginale splénique. La perte conditionnelle de BCL3 dans les cellules B entraîne une augmentation du nombre de cellules B de la zone marginale et une diminution des cellules B folliculaires (Zhang et al., 2013b). Ces données révèlent BCL3 en tant que régulateur de la détermination du devenir des cellules B, en limitant la voie dirigeant les cellules dans la zone marginale et en favorisant la voie folliculaire, par l'augmentation de la survie spécifique de cette dernière.

1.2.7.4. Modèles murins de surexpression des inhibiteurs de NF- κ B.

1.2.7.4.1. Les inhibiteurs classiques.

Les souris surexprimants les mutants I κ B α et I κ B β résistant à la dégradation (I κ Bm) sont viables et présentent les mêmes défauts de développement des structures ectodermiques telles que la peau, les follicules capillaires et les dents qui étaient similaires à ceux observés dans les embryons des souris *rel α ^{-/-}* et *crel^{-/-}* (Schmidt-Ullrich et al., 2001). L'expression dans le lignage B de I κ Bm diminue la population de cellules B matures (IgM⁺/IgD^{hi}) (Bendall et al., 1999). L'expression d'I κ Bm n'a que des effets modestes sur les niveaux basaux et induits par le LPS de NF- κ B. Ces cellules B transgéniques ont une prolifération cellulaire diminuée et une baisse de l'induction de NF- κ B en réponse à l'activation du BCR.



I.2.7.4.2. BCL3.

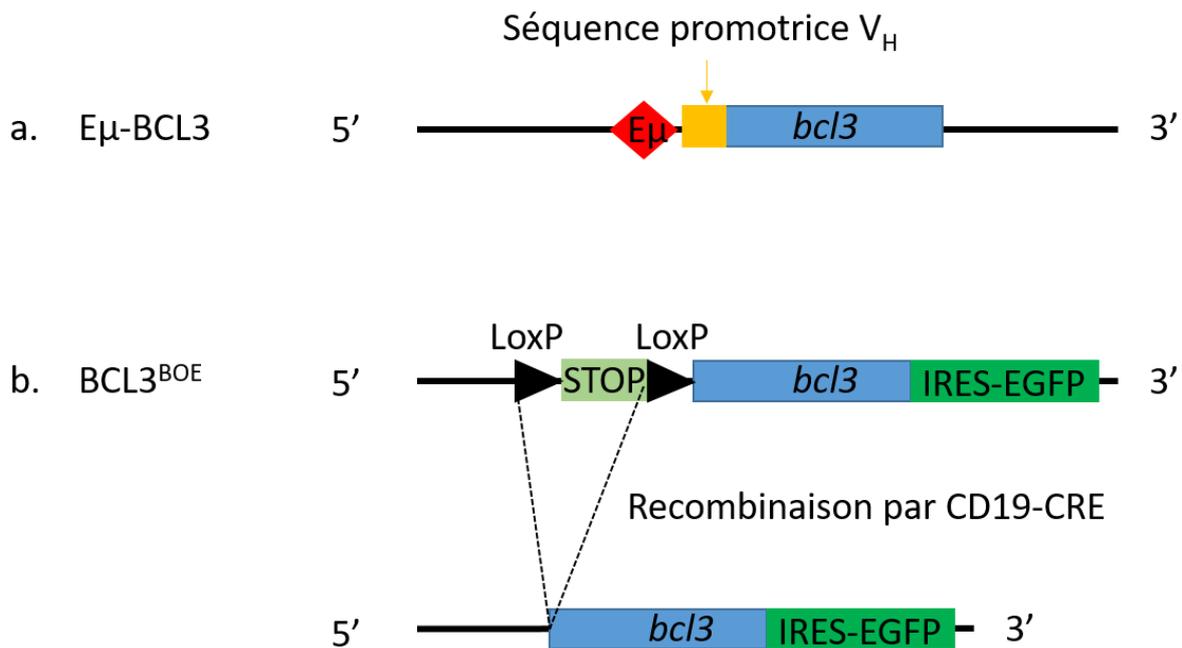


Figure 30 : Représentation schématique des transgènes *bcl3*. a. L'amplificateur E μ d'IgH murin est lié en amont d'une courte séquence promotrice de V_H murin qui liés eux-mêmes à la séquence codante de *bcl3* humain, isolée à partir de l'ADNc. b. L'ADNc de *Bcl-3* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CD19-Cre pour obtenir des souris BCL3^{BOE}. Le transgène contient également une séquence IRES et une séquence codant pour EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). (Hövelmeyer et al., 2014; Ong et al., 1998)

Des modèles de souris surexprimant BCL3 dans leurs cellules B ont été développés pour étudier les fonctions oncogéniques de BCL3 (**Figure 30**). Les souris E μ -BCL3 expriment un transgène *bcl3* humain dans leurs cellules B (Ong et al., 1998). Le transgène est inséré aléatoirement dans le génome. Ce modèle mime la translocation t(14;19) retrouvée dans les LLC juxtaposant le gène *bcl3* au locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline et entraînant une surexpression de l'ARNm entier de BCL3 (Ohno et al., 1990). Un autre modèle de surexpression de BCL3 a été développé BCL3^{BOE}. Le transgène *bcl3* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26. La cassette transcriptionnelle comporte un codon STOP flanqué de séquences LoxP, donc ce modèle est croisé avec le modèle CD19-Cre, permettant l'expression de la recombinaise. Le codon STOP est alors excisé dans les cellules B (Hövelmeyer et al., 2014).

Dans ces modèles, il y a une expansion du compartiment B, avec une accumulation de cellules FO dans plusieurs organes : la rate, les ganglions, la moelle osseuse et la cavité

péritonéale. Malgré cela, ces animaux ne développent pas de tumeurs malignes lymphoïdes, indiquant que la surexpression de BCL3 seule n'est pas suffisante pour conduire à la lymphomagenèse (Hövelmeyer et al., 2014; Ong et al., 1998; Zhang et al., 2013b). Les cellules B de la ZM sont pratiquement absentes des souris surexprimant le transgène *bc13* uniquement dans les cellules B (Hövelmeyer et al., 2014; Zhang et al., 2013b). Les souris Bcl-3^{BOE} présentent également une déficience en précurseurs de cellules B de la ZM et moins de cellules B1 dans la cavité péritonéale. Le nombre croissant de cellules B FO dans ces souris transgéniques peut être causé par cette différenciation biaisée. Ce défaut dans la différenciation pousse plus de précurseurs de cellules B dans le pool de cellules B FO. En outre, il est également possible que la surexpression de BCL3 modifie la dépendance des cellules B FO aux facteurs de survie cellulaire, tels que BAFF (Hövelmeyer et al., 2014; Zhang et al., 2013b).

1.2.7.5. Modèles murins d'invalidation des gènes des sous-unités IKK.

Les souris mutantes dépourvues d'IKK α (*ikka*^{-/-}) présentent un ensemble de défauts morphologiques qui touche le développement squelettique et épidermique (Hu et al., 1999; Li et al., 1999a). Le manque de concordance entre le phénotype des souris *ikka*^{-/-} et les souris dépourvues de facteurs de transcription NF- κ B simples ou multiples est resté inexplicé jusqu'à ce qu'il soit démontré que les défauts de la peau observés chez les souris *ikka*^{-/-} sont indépendants de l'activité kinase d'IKK α ou de l'activation de NF- κ B. IKK α interagit avec d'autres protéines pour induire l'expression d'un facteur de différenciation (Hu et al., 2001). C'est pourquoi un modèle murin comportant une version mutée d'*ikka* sur sa partie catalytique a été créé (*ikk*^{AA/AA}). Le gène est muté sur les résidus de sérine 168 et 172 (Cao et al., 2001). Les souris *ikk*^{AA/AA}, comme celles qui n'ont pas de *nfkb2*, présentent des défauts dans l'organogenèse lymphoïde et la formation de centre germinatif (Bonizzi et al., 2004). Dans le lignage des cellules B, IKK α est essentiel pour le développement des cellules B (Pasparakis et al., 2002). Les chimères avec de la moelle osseuse reconstituée avec des progéniteurs hématopoïétiques fœtaux du foie *ikka*^{-/-} ont une déficience en cellules B matures circulantes IgM^{low}IgD^{high}. Conformément à ce phénotype résultant d'un échec à soutenir la survie des cellules B matures, les cellules B *ikka*^{-/-} dans ces chimères présentent un renouvellement accru et des niveaux d'apoptose élevés (Kaisho et al., 2001).

Une absence d'IKK β (*ikkb*^{-/-}) entraîne une mort embryonnaire des souris comme les souris *rela*^{-/-} (Li et al., 1999b; Tanaka et al., 1999). Il a donc été développé des modèles



conditionnels d'inactivation du gène *ikkb*. Dans les cellules B, IKK β n'est pas essentiel pour le développement précoce des lymphocytes B, mais est crucial pour le maintien des populations de cellules B spléniques folliculaires et de la zone marginale (Pasparakis et al., 2002). Les cellules B déficientes en IKK β ont une diminution de leur survie cellulaire (Li et al., 2003). *Ex vivo*, les cellules B présentent des défauts dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération en réponse aux stimulations aux LPS, anti-CD40 et anti-IgM (Ren et al., 2002). Ces cellules présentent également des défauts dans la production de sous-classes spécifiques d'Ig (IgM, IgG3, IgG2a) en réponse aux antigènes T-dépendants et T-indépendants. IKK β est donc essentiel pour la prolifération des cellules B et le contrôle de certains aspects de la réponse humorale.

I.2.7.6. Modèles murins d'activation constitutive de la sous-unité IKK β .

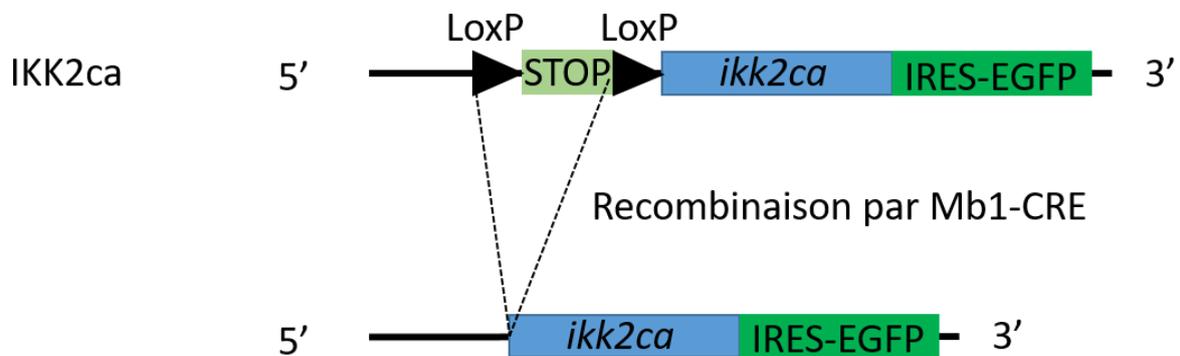


Figure 31 : Représentation schématique du modèle murin IKK2ca. L'ADNc d'*ikk2ca* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris Mb1-Cre pour obtenir des souris IKK2ca. Le transgène contient également une séquence IRES et une séquence codant pour EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Sasaki et al., 2006).

Un modèle murin exprimant la protéine IKK β constitutivement active a été développé. Dans ce modèle, la protéine IKK β est mutée sur les résidus sérines 171 et 181 (IKK2ca) et permet une activation constitutive de la voie NF- κ B (**Figure 31**) (Sasaki et al., 2006). Le transgène *ikk2ca* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26. La cassette transcriptionnelle comporte un codon STOP flanqué de séquences LoxP, donc ce modèle est croisé avec le modèle Mb1-CRE, permettant l'expression de la recombinaise. Le codon STOP est alors excisé spécifiquement dans les cellules B. Les souris avec l'expression constitutive d'IKK2ca montrent une durée de vie similaire à celle des souris sauvage. L'étude macroscopiques des souris IKK2ca, sacrifiées très tard entre 550 et 600 jours, révèlent une

splénomégalie avec une hyperplasie des cellules B et plasmiques dans la rate et la moelle osseuse (Calado et al., 2010; Sasaki et al., 2006).

Pour compléter ce modèle, celui-ci a été croisé avec un autre modèle murin permettant de supprimer BLIMP1 (Calado et al., 2010). BLIMP1 est un suppresseur de tumeur fréquemment inactivé dans les DLBCL de type ABC (Mandelbaum et al., 2010). Cette étude montre que l'activation constitutive de NF- κ B *via* IKKca avec l'extinction de BLIMP1 conduit à une lymphomagenèse accélérée par rapport à l'extinction de BLIMP1 seul. Ces souris succombent à une maladie lymphoproliférative dérivée de cellules B affectant la rate et les ganglions lymphatiques ressemblant à des ABC-DLBCL humain (Calado et al., 2010).

I.2.7.7. Modèles murins de surexpression de NIK.

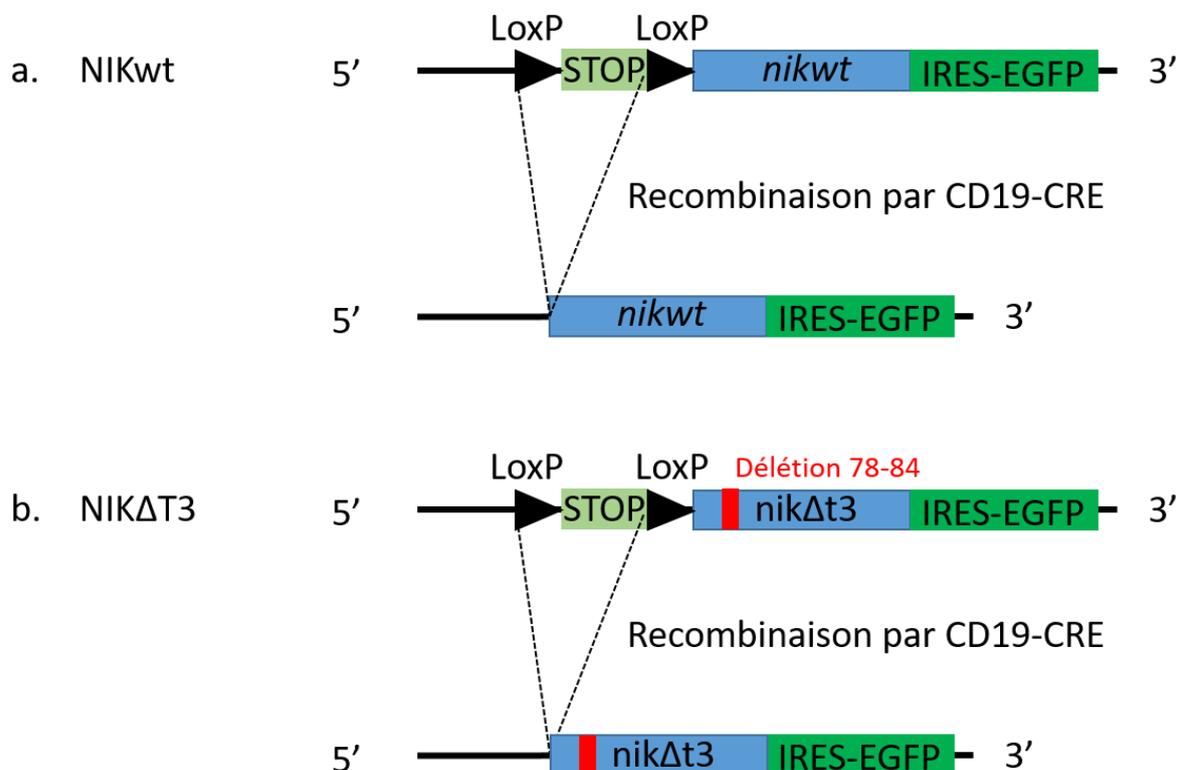


Figure 32 : Représentation schématique des transgènes *nik*. Les ADNc de *nik* sauvage (*nikwt*) et de *nik* muté sur le domaine de fixation à TRAF3 (*nik Δ t3*) sont insérés par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CD19-Cre pour obtenir des souris exprimant *nikwt* et *nik Δ t3* uniquement dans les cellules B. Le transgène contient également une séquence IRES et une séquence codant pour EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

Deux modèles murins avec une surexpression de NIK ont été créés. Ces deux modèles diffèrent par la nature de leur transgène. Le premier transgène est l'ADNc codant la protéine

NIK de type sauvage (NIKwt), le second pour un mutant de la protéine NIK dépourvu du domaine de fixation à TRAF3, T3BD (*TRAF3 binding domain*) (NIK Δ T3) (**Figure 32**). La perte de ce domaine empêche la dégradation médiée par TRAF3 de NIK par le protéasome (Liao et al., 2004). Les transgènes *nik* ou *nik Δ t3* sont insérés par recombinaison homologue dans le locus ROSA26. La cassette transcriptionnelle comporte un codon STOP flanqué de séquences LoxP. Ce modèle a été croisé avec le modèle CD19-CRE, permettant l'expression de la recombinase. Le codon STOP est alors excisé spécifiquement dans les cellules B (Sasaki et al., 2008). Les souris NIKwt présente une splénomégalie ainsi que de plus gros ganglions lymphatiques. Les souris NIK Δ T3 présentent les mêmes symptômes mais de façon beaucoup plus importante. Les cellules B des souris NIKwt ont une expansion de leur nombre dans la ZM mais ne sont pas activées. Alors que les cellules B des souris NIK Δ T3 ressemblent à des cellules B activées de la ZM. En outre, les cellules B des souris NIK Δ T3 sont indépendantes du signal BAFF/BAFFR et donc du contrôle négatif de TRAF3 pour le clivage de p100 et l'activation de NF- κ B (Sasaki et al., 2008). Ces modèles murins ne développent pas de lymphome B malgré une hyperplasie des cellules B et une augmentation de la survie.

Le modèle NIKwt a été croisé avec un modèle permettant la surexpression de BCL6 afin de mimer la dérégulation de cette protéine retrouvée dans les DLBCL. La dérégulation de BCL6 est retrouvée dans 26% des ABC-DLBCL (Pasqualucci et al., 2011). En effet, BCL6 permet de réprimer l'expression de BLIMP1 (Tunyaplin et al., 2004). Dans ce modèle double, le transgène *bcl6* est sous le contrôle du promoteur μ de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Cattoretti et al., 2005). Les souris doubles ont une splénomégalie massive et une forte augmentation de la taille des ganglions. L'examen histologique des organes lymphoïdes montre que ces souris ont une maladie de type DLBCL, caractérisée par une croissance diffuse de grandes cellules B. L'analyse des réarrangements des IgH révèle que les cellules de la tumeur sont clonales. Ce même clone tumorale est retrouvé dans la rate et les ganglions indiquant un phénotype agressif (Zhang et al., 2015).

1.2.7.8. Modèles murins de régulateurs de la voie NF- κ B fréquemment mutés dans les lymphomes B.

1.2.7.8.1. A20.

Le gène *tntfip3* est une cible de NF- κ B et code la protéine A20 qui est un régulateur négatif de la voie NF- κ B (Cooper et al., 1996). Les souris déficientes pour A20 succombent

d'une inflammation de plusieurs organes (Lee et al., 2000; Vereecke et al., 2009). Un modèle murin conditionnel permettant l'invalidation du gène A20 dans les cellules B entraîne une hyperactivation de NF-κB. Cette activation permet une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. Ces souris ont une augmentation de l'expression de cytokines pro inflammatoires (IL-6) et ainsi présentent une inflammation progressive avec expansion des cellules myéloïdes et des cellules T régulatrices. Chez les souris âgées, il y a le développement d'une pathologie auto-immune caractérisée par une splénomégalie, une hyperplasie plasmocytaire et la présence d'auto-anticorps. Mais ce modèle ne développe pas de lymphomes B (Chu et al., 2011).

I.2.7.8.2. MYD88.

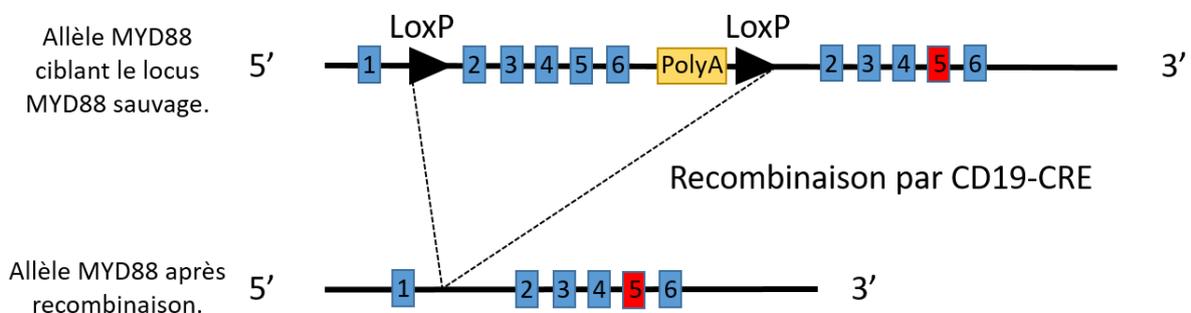


Figure 33 : Représentation schématique du transgène MYD88^{L252P}. Le locus MYD88 endogène est ciblé avec le vecteur linéarisé comportant l'exon 1 du gène suivi des exons 2 à 6 et d'un signal de polyadénylation flanqués de site LoxP. En 3' du LoxP' les exons 2 à 6 avec l'exon 5 muté. Après recombinaison médiée par CRE spécifiquement dans les cellules, le transcrit muté est exprimé (Knittel et al., 2016).

La protéine adaptatrice MYD88 est impliquée dans la transduction du signal entre les TLR et NF-κB. Un modèle présentant la mutation L252P (équivalant murin de la mutation L265P retrouvée dans de nombreux lymphomes humains (Ngo et al., 2011)) au locus endogène de MYD88 a été développé (**Figure 33**). Le transgène *myd88* ciblant le locus MYD88 est composé de l'exon 1 du gène suivi des exons 2 à 6 et d'un signal de polyadénylation flanqués de site LoxP. Ce signal de polyadénylation empêche la transcription du reste du transgène en 3'. Le transgène comporte après le site LoxP en 3' les exons 2 à 6 avec l'exon 5 muté. Après recombinaison avec la recombinaise CRE, le transcrit portant la mutation L252P peut être exprimé. Cette protéine mutée est exprimée spécifiquement dans les cellules B. Ces souris développent des syndromes lymphoprolifératifs, l'analyse des infiltrats spléniques et hépatiques révèle que ces lésions constituent une population de cellules lymphoïdes

largement monomorphes avec une apparence indolente. Occasionnellement ces souris développent des lymphomes B clonaux, morphologiquement et immunophénotypiquement caractéristiques des ABC-DLBCL et ont une survie d'environ 80 semaines (Knittel et al., 2016).

Pour essayer d'augmenter la fréquence de développement de lymphomes proches des ABC-DLBCL, ces souris ont été croisées avec un modèle murin surexprimant BCL2 de façon spécifique aux cellules B. La combinaison de la mutation de MYD88 et la surexpression de BCL2 induit le développement de lymphomes B de type ABC-DLBCL. Ces souris ont une survie de 179 jours. L'étude morphologique des lésions spléniques, hépatiques et ganglionnaires détectées chez les souris doubles transgéniques révèlent que les infiltrations se composent presque entièrement de grandes cellules lymphoïdes diffuses avec un aspect blastoïde à plasmablastique (Knittel et al., 2016).

1.2.7.8.3. Modèles murins du complexe CBM.

Comme dit précédemment (*cf* 1.2.3.1) l'activation de NF- κ B par le BCR est initiée par les tyrosines kinases proximales du récepteur qui déclenchent l'activation des protéines en aval (PKC β et PI3K). Le lien clé avec le complexe IKK est la protéine CARD11, qui est inactive dans les cellules en repos. L'activation des lymphocytes B induit la phosphorylation de CARD11 par la PKC β . Ce qui entraîne le recrutement de BCL10 et de MALT1, et donc la formation du complexe CARD11/BCL10/MALT1 (CBM). Le recrutement supplémentaire de facteurs d'activation tels que les protéines TRAF, ainsi que IKK et TAK1, conduit à l'activation d'IKK et de la voie JNK (pour revue : (Seda and Mraz, 2015).

1.2.7.8.3.1. CARD11.

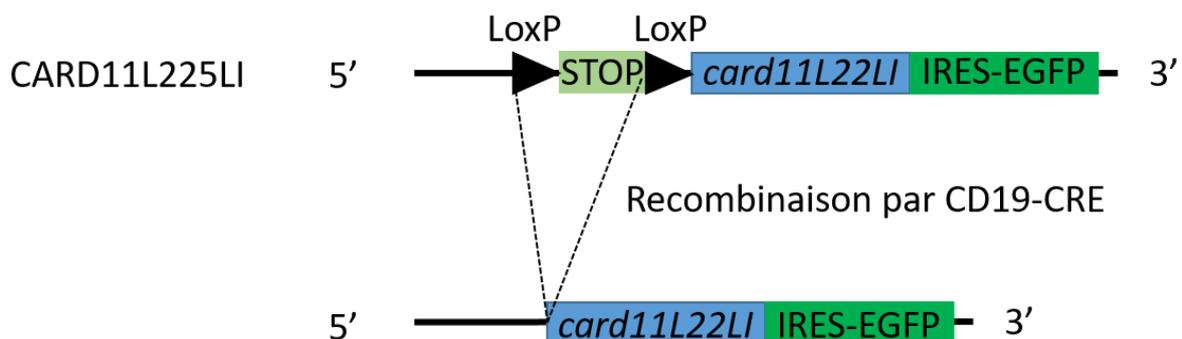


Figure 34 : Représentation schématique du modèle murin CARD11L225LI. L'ADNc de *card11/225li* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CD19-Cre pour obtenir des souris CARD11L225LI. Le transgène contient

également une séquence IRES et une séquence codant pour EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Knies et al., 2015).

Un modèle murin mimant la mutation du gène *card11* (L225LI) dans les ABC-DLBCL permet d'activer constitutivement CARD11 et de permettre le recrutement de BCL10 et MALT1 de façon autonome (Lenz et al., 2008). Le transgène *card11/L225li* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26. Ce modèle est croisé avec le modèle CD19-CRE, permettant l'expression de la recombinaise (**Figure 34**). Ces souris meurent toutes après 6 jours avec une splénomégalie massive et une lymphadénopathie. L'étude histologique des rates montre des populations homogènes de grandes cellules avec des noyaux proéminents et avec un indice de prolifération élevé (Ki67>75%). Ces cellules infiltrent des organes solides, y compris le foie, affichant ainsi les caractéristiques histopathologiques caractéristiques des lymphomes de haut grade. L'activité NF-κB dans ces cellules a été mesurée par EMSA (*Electro mobility shift essay*) et par analyse de la localisation nucléaire des sous-unités. On observe une augmentation de la translocation nucléaire de RelA, c-Rel et p50 ainsi qu'une augmentation de l'activité de NF-κB (Lenz et al., 2008). La mutation de CARD11 induit l'activation de la voie NF-κB et JNK (Knies et al., 2015). Or par immunohistochimie, 55% des biopsies de 47 patients atteints d'ABC-DLBCL sont positifs pour l'activation de la voie JNK. JNK aurait également un rôle dans la lymphomagenèse induite par la mutation de *card11* qui ne serait donc pas due uniquement à la voie NF-κB (Knies et al., 2015).

I.2.7.8.3.2. BCL10.



Figure 35 : Représentation schématique du transgène EμBCL10. L'ADNc humain de *bcl10* de type sauvage est placé sous le contrôle de l'amplificateur / promoteur EμSRα en amont d'une séquence signal de polyadénylation (PolyA) (Li et al., 2009).

Le gène *bcl10* est retrouvé transloqué dans le locus de la chaîne lourde d'Ig dans les lymphomes de MALT. Un modèle murin plaçant le gène *bcl10* sous le contrôle des amplificateurs et promoteurs EμSRα a été développé pour miner cette translocation. Le gène humain *bcl10* est également placé en amont d'un signal de polyadénylation (**Figure 35**). Le transgène est inséré de façon aléatoire dans le génome par microinjection d'ovocytes murins fertilisés (Li et al., 2009). Les souris EμBCL10 développent une splénomégalie dès 6 à 8

semaines. Histologiquement, les rates de ces souris ont un élargissement de la ZM qui, avec l'âge, provoque une disparition progressive de la pulpe blanche et rouge. Les études immunohistochimiques ont confirmé l'expansion de la population de cellules B B220⁺. L'analyse des marqueurs CD21 et CD23 par cytométrie montre que l'expression constitutive du BCL10 diminue le développement des cellules B précoces, FO et B1a, mais entraîne l'expansion des cellules B de la ZM. La surexpression de BCL10 induit l'activation constitutive de NF-κB. La signalisation classique de NF-κB dans les cellules B reste sensible à la stimulation BCR, bien que la réponse semble plutôt faible par rapport aux cellules B de souris sauvage. L'activation constitutive de NF-κB permet la surexpression du récepteur BAFF. BAFF active les voies classiques et alternes NF-κB favorisant la survie des cellules B, l'augmentation du pool de cellules B de la ZM et la rétention des cellules B dans la ZM. La régulation à la hausse de BAFF provoquée par BCL10 génère une boucle autocrine, avec une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules B dues en partie à la stimulation des voies NF-κB. Ces souris développent des lymphomes de la ZM. Histologiquement, ces lymphomes de la ZM au stade le plus précoce montrent des extensions dans la pulpe rouge qui compriment la pulpe blanche. Avec l'âge, les rates des souris développant des lymphomes présentes une occupation totale par les cellules tumorales de type centroblastique. Ce développement est dose dépendant et tardif, en effet les souris ayant les deux copies du transgène EμBCL10 développent des lymphomes plus rapidement et ont une durée de vie plus courte (519 jours vs 429 jours). L'expression constitutive de BCL10 dans les cellules B aboutit à l'expansion préférentielle précoce d'une population de cellules B de la ZM polyclonale suivie par le développement de lymphomes monoclonaux de cellules B de la ZM (Li et al., 2009).

I.2.7.8.3.3. BIRC3/MALT1.



Figure 36 : Représentation schématique du transgène EμBIRC3/MALT1. L'ADNc de la protéine de fusion BIRC3/MALT1 est placé sous le contrôle de l'amplificateur / promoteur EμSRα en amont d'une séquence signale de polyadénylation (PolyA) (Baens et al., 2006).

L'expression de la protéine de fusion BIRC3/MALT1 oncogénique, retrouvée dans les lymphomes de MALT, a été mimée dans un modèle murin dans lequel l'ADNc de BIRC3/MALT1, fusion entre l'exon 7 de *birc3* et l'exon 8 de *malt1*, est sous le contrôle des amplificateurs et promoteurs EμSRα (**Figure 36**). Comme pour le modèle EμBCL10, le

transgène est inséré de façon aléatoire dans le génome par microinjection d' ovocytes murins fertilisés (Baens et al., 2006). Deux souches de souris ont été sélectionnées, la souche AM37 qui exprime un niveau de BIRC3-MALT1 dans les lymphocytes spléniques égal à la protéine MALT1 endogène, et la souche AM31 qui a une expression 4 fois plus élevée. Dans ces deux souches de souris, aucun signe histologique de développement spontané de lymphome n'a pu être trouvé après 50 semaines d'observation. En outre, aucune différence macroscopique ou microscopique n'a été notée dans aucun des organes examinés pendant le vieillissement. Cependant, certaines différences sont trouvées dans la rate des souris transgéniques AM31: chez ces animaux, les centres germinatifs sont bien formés à l'âge de 5 semaines, bien qu'ils n'aient pu être identifiés avant l'âge de 10 semaines chez les souris sauvages. À l'âge de 10 semaines, ces centres germinatifs sont plus importants et le sinus marginal est plus important. Le manteau folliculaire, comprenant la couronne lymphocytaire et la zone marginale, a également tendance à être plus important chez les souris transgéniques AM31. Les souris AM31 ont une augmentation des cellules B de la ZM. La protéine BIRC3/MALT1 permet la polyubiquitination de NEMO dans ces souris. Mais le signal NF-κB ne serait pas suffisant pour induire une lymphomagenèse B dans ce modèle (Baens et al., 2006; Sagaert et al., 2006).

I.2.7.8.4. TRAF3.

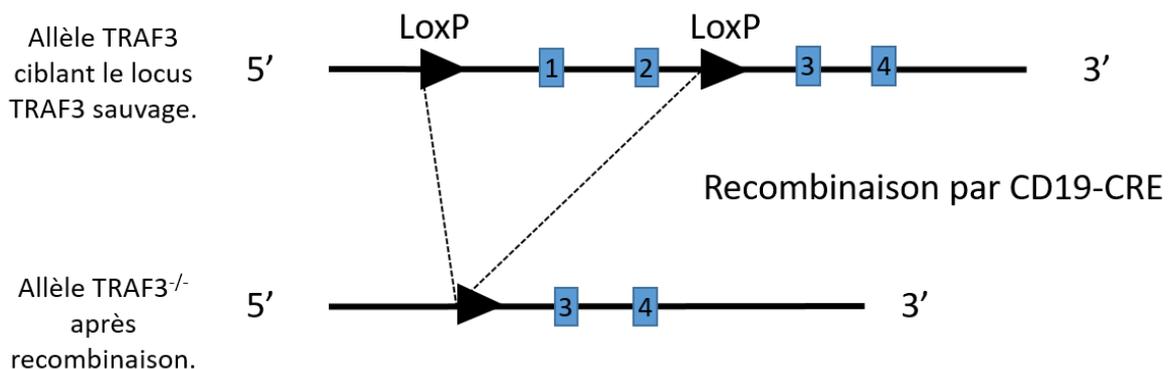


Figure 37 : Représentation schématique du modèle murin B-TRAF3^{-/-}. Le transgène contenant le gène *traf3* dont les exons 1 et 2 sont flanqués de séquence LoxP est inséré par recombinaison homologue dans le locus TRAF3 sauvage de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CD19-Cre pour obtenir des souris B-TRAF3^{-/-} (Xie et al., 2007).

Un modèle murin conditionnel inactivant TRAF3 dans les cellules B a été généré. Ce modèle B-TRAF3^{-/-} consiste en la délétion des exons 1 et 2 du gène *traf3* en flanquant la région codante pour ces exons de séquence LoxP. Ensuite grâce au croisement avec des souris CD19-

CRE, il y a excision des exons 1 et 2 (**Figure 37**) (Xie et al., 2007). Les souris B-TRAF3^{-/-} montrent une hyperplasie des cellules B, qui aboutit à une hypergammaglobulinémie, une augmentation des réponses aux antigènes T-indépendantes, une splénomégalie et une lymphadénopathie (Xie et al., 2007). Ces souris ont une forte diminution de leur survie après 9 mois. L'examen des tissus de 50 souris B-TRAF3^{-/-} de 9 à 18 mois montre que 38 de ces souris ont des lymphomes B spléniques. Les tumeurs des souris B-TRAF3^{-/-} sont proches des lymphomes de la ZM splénique, incluant des lymphomes de la ZM de haut grade avec la cytologie de DLBCL et des lymphomes de la ZM avec des caractéristiques de cellules B normales de la ZM. Les observations macroscopiques et les études microscopiques révèlent également la présence de tumeurs dans d'autres tissus, comme dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques cervicaux et mésentériques, les reins, les poumons et le foie (Moore et al., 2012). Les cellules B tumorales de ces souris sont monoclonales ou oligoclonales. De plus, l'ADN préparé à partir de deux ou trois tissus de la même souris montre une propagation métastatique du même clone. Dans ces souris, il y a activation constitutive de p50 et p52 (Moore et al., 2012).

I.2.7.8.5. Signal CD40.

Un modèle exprimant la protéine LMP1 dans les cellules B murines a été créé. Celui-ci place le gène *bnlf1* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH). *In vitro* et *in vivo*, le potentiel de prolifération est augmenté par l'expression de LMP1 dans les cellules B (Kaye et al., 1993; Kulwichit et al., 1998). Le transgène est ensuite introduit par microinjection dans des ovocytes murins fertilisés. Dans ces souris, le développement de lymphome est rare chez les souris de moins de 1 an, mais augmente à 32% chez les souris de plus de 1 an et à 42% chez la souris de plus de 18 mois. La majorité des souris atteintes de lymphome ont une splénomégalie massive. Chez 60% des animaux atteints de lymphome, le lymphome est disséminé dans le foie, les poumons ou les ganglions lymphatiques. Les lymphomes sont principalement des lymphomes à cellules B folliculaires. L'analyse du réarrangement des gènes d'Ig montre que tous les échantillons de lymphome sont monoclonaux ou éventuellement oligoclonaux. Des gènes cibles de NF-κB sont retrouvés fortement exprimés dans les cellules B tumorales, *tnaifp3*, *bcl2* et *c-myc* (Kulwichit et al., 1998; Thornburg et al., 2006).

Un autre modèle présente le gène *bnlf1* dans le locus ROSA et exprime spécifiquement LMP1 dans les cellules B. Ces souris ne développent pas de lymphomes mais le potentiel de

prolifération *in vitro* est augmenté. La déplétion des cellules T dans ce modèle induit une lymphomagenèse B importante. En effet en présence des cellules T, les cellules B exprimant LMP1 sont éliminées (Zhang et al., 2012). LMP1 est un oncogène très fort mais induit également une forte immunogénicité T et NK-dépendante. Cette immunogénicité doit être contrée pour permettre la transformation des cellules B.

Pour avoir un signal constitutif CD40, un modèle murin exprimant la protéine chimérique LMP1/CD40 a été développé. Cette protéine est constituée de la partie N-terminale transmembranaire de LMP1 et du domaine de signalisation C-terminal intracellulaire du CD40 humain : ce qui permet un signal constitutif CD40 indépendant du ligand. Une copie du gène chimérique LMP1/CD40 est insérée par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 murin des cellules souches embryonnaires ES.

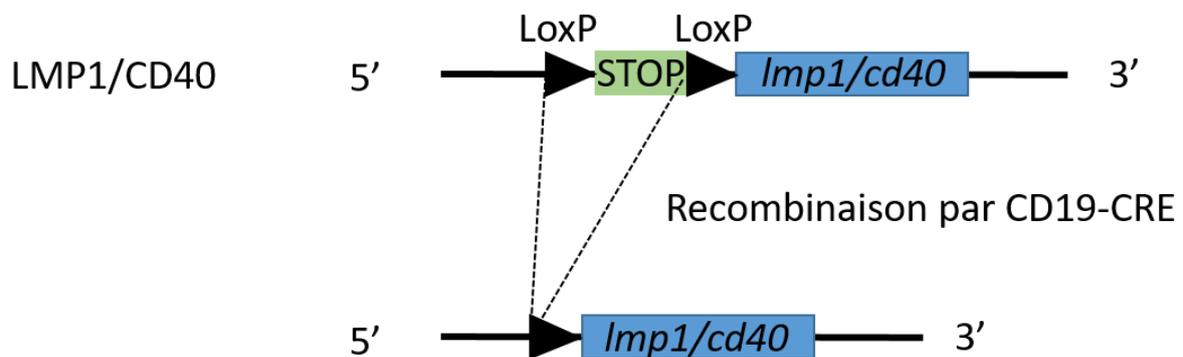


Figure 38 : Représentation schématique du modèle murin LMP1/CD40. Le transgène contenant le gène chimérique *Imp1/cd40* est inséré par recombinaison homologue dans le locus ROSA26 de la souris. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris CD19-Cre pour obtenir des souris LMP1/CD40 (Hömig-Hölzel et al., 2008).

Ce modèle est alors croisé avec le modèle CD19-CRE. Après l'excision médiée par Cre de la cassette d'arrêt, le transgène LMP1/CD40 est placé sous le contrôle du promoteur ROSA26 actif de façon ubiquitaire (**Figure 38**) (Hömig-Hölzel et al., 2008). L'expression conditionnelle de LMP1/CD40 dans les cellules B entraîne une splénomégalie chez les souris de 8 à 16 semaines. Cette splénomégalie est due en grande partie au nombre accru de cellules B. Dans les ganglions lymphatiques, le nombre de cellules est augmenté par rapport aux souris témoins. Les cellules B de la rate présentent un profil activé, avec l'expression membranaire de CD86, CD80, CD95, ICAM1 ou encore le CMH de classe 2 (complexe majeur d'histocompatibilité). Les cellules B des souris ont une activation constitutive de la voie alterne

de NF- κ B. De plus, la protéine LMP1/CD40 induit une activation des voies MAPK et JNK. Ces voies participent à la prolifération et à la survie cellulaire de ces cellules B. 60 % des souris exprimant LMP1/CD40 entre 12 et 19 mois montrent une splénomégalie extrême avec une augmentation de poids de 20 à 40 fois par rapport au témoin, une lymphadénopathie, une hépatomégalie et des infiltrations nodulaires dans le rein, le poumon et le foie. Ces tumeurs sont mono ou oligoclonales. Dans ces cellules tumorales, il y a l'activation constitutive des voies alternes de NF- κ B, MAPK et JNK suggérant une action de concert de ces voies dans la lymphomagenèse B (Hömig-Hölzel et al., 2008). L'activation de la voie MAPK est dépendante du CD19. Quand CD19 est éteint, la lymphomagenèse ne se fait plus. MAPK serait indispensable à la lymphomagenèse (Hojer et al., 2014). Il est à noter que dans ces souris, il y a également une augmentation du nombre et de l'activation des cellules T dans la rate. Cette augmentation pourrait être provoquée par les lymphocytes B exprimant LMP1/CD40. Cet effet serait indépendant de l'antigène. Il a été démontré que la production de cytokines, ainsi que de molécules de surface cellulaire, exprimées sur les cellules présentatrices d'antigène pendant une réponse immunitaire, peuvent activer les cellules T non spécifiques (Ehl et al., 1997). De plus, les cellules présentatrices d'antigène activées par CD40 favorisent l'expansion de cellules T mémoires (Koschella et al., 2004). Ces éléments suggèrent que les cellules B exprimant LMP1/CD40 peuvent générer un environnement favorable à l'activation des cellules T.

1.2.7.9. Conclusions sur les différents modèles murins NF- κ B.

L'ensemble de ces modèles est résumé dans le **tableau 1** qui suit et permet de montrer que l'activation des voies de NF- κ B (canonique et non canonique) permet une augmentation de la prolifération et de la survie des cellules B. Notamment les modèles d'inactivation montrent tous le rôle de NF- κ B dans le maintien des fonctions B et les modifications d'activation montrent le potentiel prolifératif des B. Mais cette activation ne semble pas être suffisante pour conduire à la formation de lymphome. La lymphomagenèse de ces modèles se fait grâce à la coopération avec d'autres voies oncogéniques que ce soit par des pertes de fonctions de suppresseurs de tumeur ou l'activation de proto-oncogènes. NF- κ B permet d'augmenter le potentiel oncogénique, mais n'est pas lui-même oncogénique.

De plus, l'activation continue de NF- κ B conduit à une augmentation de la surveillance immune et une dérégulation du système immunitaire (réaction inflammatoire, augmentation



expression de cytokines). L'activation de NF-κB pourrait avoir un aspect néfaste sur la reconnaissance et la destruction des cellules B.

Tableau 1 : Résumé des différents modèles murins présentant une dérégulation de la voie NF-κB.

Gènes/Transgènes	Effets	Développement de Lymphomes
Invalidation de gène		
<i>nfkb1</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution des cellules B de la ZM et du péritoine - Défauts dans la structure des organes lymphoïdes secondaire - Diminution de la prolifération B suite à des stimuli au LPS 	non
<i>nfkb2</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution du compartiment B - Altérations de l'architecture splénique et ganglionnaire - Diminution de la prolifération B en réponse au LPS et CD40 	non
<i>c-ret</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Développement précoce des lymphocytes B normaux et population B mémoire diminuée 	non
<i>rela</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mort embryonnaire - Génération de cellules B très fortement diminuée 	non
<i>relb</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Défauts structures organes lymphoïdes secondaires - Défauts d'activation des cellules T via les cellules dendritiques 	non
<i>ikba</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mort après 7 à 10 jours due à une inflammation généralisée - Augmentation de la prolifération B suite à des stimuli mitogénique 	non
<i>ikbe</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de certains isotypes d'Ig et de cytokines - Pas de modification de la prolifération B 	non
<i>bcl3</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Architecture splénique altérée - Diminution des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires 	non
<i>ikka</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mort à la naissance 	non
<i>ikka</i> ^{AA/AA}	<ul style="list-style-type: none"> - Défauts dans l'organogenèse lymphoïde - Problèmes dans le développement B 	non
<i>ikkb</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mort embryonnaire - Modèle conditionnel B : diminution de la survie, diminution 	non



	de la prolifération B en réponse aux stimuli (LPS, CD40)	
Surexpression/sur-activation de gène		
<i>nfkb1</i> ^{ΔCT/ΔCT}	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie, lymphadénopathie - Infiltration lymphoïde dans divers organes - Augmentation de la prolifération B 	non
<i>nfkb2</i> ^{ΔCT/ΔCT}	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperkératinisation de la rate - Lymphadénopathie - Infiltration lymphoïde dans divers organes - Augmentation de la prolifération B 	non
<i>ikbm</i> (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Défauts de développement des structures ectodermique - Diminution de la population B mature - Diminution de la prolifération B induite par le LPS et le BCR 	non
Eμ-BCL3 BCL3BOE (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Expansion du compartiment B - Peu de cellules B de la ZM et accumulation de cellules B folliculaires 	non
IKK2ca (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Survie similaire aux souris sauvages - Splénomégalie tardive (550 à 600 jours) - Hyperplasie des cellules B 	Non, mais développement de lymphome de type ABC-DLBCL quand couplé avec la perte de BLIMP1
NIKwt (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie et lymphadénopathie - Expansion de nombre de cellules B de la ZM 	Non, mais développement de lymphome de type DLBCL quand couplé à surexpression de BCL6
NIKΔT3 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie et lymphadénopathie plus importante que dans le modèle NIKwt - Cellules B ressemblent à des cellules B activées de la ZM 	non
Gènes fréquemment dérégulés dans les lymphomes B		
A20 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Mort due à l'inflammation de plusieurs organes - Dans modèle conditionnel B : augmentation de la prolifération et de la survie des cellules B. Splénomégalie, hyperplasie plasmocytaire (auto-anticorps) 	non



MYD88L252P (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la prolifération B - Infiltration lymphoïde dans la rate et le foie 	<ul style="list-style-type: none"> - Rare Lymphome de type ABC-DLBCL après 80 semaines - Apparition de lymphome de type ABC-DLBCL accélérée quand couplé avec surexpression de BCL2
CARD11L235LI (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Mort après 6 jours - Splénomégalie et lymphadénopathie - Augmentation de la prolifération B - Infiltration lymphoïde dans divers organes 	Oui, lymphome de haut grade
Eμ-BCL10 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie (6 à 8 semaines) - Diminution des cellules B folliculaires et B1a et augmentation des cellules B de la ZM 	Oui, lymphomes de la ZM
BIRC3/MALT1 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des cellules B de la ZM 	non
TRAF3 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie et lymphadénopathie - Hyperplasie B : hypergammaglobulémie 	Oui, lymphome de la ZM
IgH-LMP1 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie - Lymphome disséminé dans le foie, les poumons et les ganglions chez 60% des cas de lymphomes 	Oui, lymphome à cellules B folliculaires (>42% chez souris de plus de 18 mois)
ROSA-LMP1 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation potentiel de la prolifération B <i>in vitro</i> - Cellules T éliminent les cellules B exprimant LMP1 	non
LMP1/CD40 (B spécifique)	<ul style="list-style-type: none"> - Splénomégalie et lymphadénopathie - Cellules B de la rate ont un profil activé - Augmentation de la prolifération B 	Oui, lymphome entre 12 et 19 mois

I.3. Objectifs.

Des travaux réalisés au laboratoire sur des modèles de lymphomes post-transplantation associés au virus d'Epstein-Barr (EBV) ont identifié c-Myc et NF-κB comme les deux systèmes transcriptionnels de la latence III, suggérant que ces deux systèmes peuvent coexister en fonction du contexte tumoral (Faumont et al., 2009).



Les lymphomes B agressifs tels que les DLBCL sont associés à des dérégulations de facteurs de transcription. Les DLBCL présentent une dérégulation de l'oncogène c-Myc et sont classés en plusieurs sous-groupes selon l'activation du facteur de transcription NF- κ B : type centroblastique (GCB) et type « lymphocyte activé » (ABC) avec activation constitutive de NF- κ B (Alizadeh et al., 2000). Cette activation constitutive peut être due à la présence de l'oncogène majeur de l'EBV, LMP1 ; ou des altérations géniques (TNFAIP3/A20, TRAF2, TRAF5, CARD11, MYD88) ; ou encore à l'activation du BCR ou du CD40 (récepteur membranaire des lymphocytes B). L'activation constitutive de NF- κ B est très probablement un événement oncogénique majeur étant donné d'une part, l'addiction des cellules tumorales à NF- κ B et d'autre part, la récurrence des anomalies retrouvées sur cette voie.

L'objectif global de mon travail de thèse est d'étudier l'impact de l'oncogène c-Myc dans un contexte de sur-activation de NF- κ B afin de comprendre l'effet de ces dérégulations dans les lymphomes B agressifs.

Trois modèles d'étude sont présentés :

- Etude *in vitro* de la synergie entre une activation de NF- κ B par EBV/LMP1 et une surexpression de c-Myc dans le modèle cellulaire B P493-6 (Pajic et al., 2000).
- Etude de l'impact au stade pré-tumoral, tant sur la cellule B que sur le microenvironnement immunitaire, d'une activation du TLR9 sur la lymphomagenèse dépendante de c-Myc dans un modèle murin surexprimant c-Myc dans les cellules B (Kovalchuk et al., 2000).
- Etude d'un modèle murin double transgénique « L.CD40/ λ c-Myc » : activation constitutive de CD40 et c-Myc.



II.1. Article.

II.1.1. Introduction.

Comme vu précédemment, NF- κ B est associé à divers types de lymphomes B, et plus particulièrement aux DLBCL de type ABC et aux DLBCL associés à l'EBV. Les DLBCL de type ABC ont un phénotype activé et sont plus agressifs et de moins bon pronostic que les DLBCL de type GCB (Lenz and Staudt, 2010). Le pronostic des DLBCL associés à l'EBV chez les personnes âgées, qui ont aussi un profil d'ABC-DLBCL, est mauvais. Des altérations géniques du gène *c-myc* sont retrouvées dans les ABC-DLBCL, entraînant sa surexpression. La surexpression isolée de c-Myc dans les cellules B entraîne l'émergence de lymphomes B agressifs, mais avec un phénotype non activé. Nous avons donc posé la question de l'effet de la surexpression de c-Myc dans des cellules B activées par NF- κ B.

Pour la réalisation de ces expérimentations, nous avons utilisé divers stimuli de la voie NF- κ B. Tout d'abord, l'activation de la latence III de l'EBV, qui comme décrit précédemment (cf I.2.3.3) permet l'expression de LMP1 qui permet l'activation de la voie classique et alterne de NF- κ B.

Ensuite, nous avons utilisé l'activation du récepteur TLR9. Comme vu en introduction, la signalisation du récepteur TLR9 fait intervenir la protéine adaptatrice MYD88 (Wertz and Dixit, 2010). Plusieurs études montrent des mutations activatrices de MYD88 chez des patients atteints d'ABC-DLBCL (Bohers et al., 2015; Ngo et al., 2011). L'activation de NF- κ B par le TLR9 pourrait favoriser l'émergence de lymphomes B.

Et pour finir, nous avons utilisé un signal constitutif CD40. Ce signal est obtenu grâce au modèle murin LMP1/CD40 décrits dans le paragraphe I.2.7.8.5 (Hömig-Hölzel et al., 2008). Un signal constitutif CD40 est retrouvé dans les ABC-DLBCL (Pham et al., 2002, 2005).

Nous avons ainsi montré dans un modèle cellulaire *in vitro*, P493-6 (Pajic et al., 2000) capable d'induire le programme de la latence III de l'EBV (expression de LMP1) par ajout d'œstradiol et de réprimer une surexpression de c-Myc par retrait de tétracycline dans le milieu de culture, que c-Myc augmente la prolifération des cellules B en latence III (activation de NF- κ B).



Nous avons aussi montré que la co-activation du TLR9 et de c-Myc augmente la prolifération des cellules B. Cette augmentation a été observée dans un modèle *in vitro* (P493-6) et *in vivo* (souris λ c-Myc) (Kovalchuk et al., 2000).

Pour finir, dans un modèle murin présentant une activation constitutive du CD40 et une surexpression de c-Myc, nous avons montré que ces souris présentent une lymphomagenèse agressive avec un phénotype activé proche de ce que l'on peut observer dans les ABC-DLBCL humain.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article scientifique ci-après, dont je suis co-premier auteur. J'ai réalisé l'étude de l'effet *in vitro* et *in vivo* de la stimulation du TLR9, ainsi que l'étude de l'expression des gènes dans les modèles murins L.CD40, λ c-Myc et L.CD40/ λ c-Myc.



II.1.2. Manuscrit.

c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- κ B activated B cells.

David A^{1,2}, Arnaud N^{1,2}, Fradet M^{1,2}, Lascaux H^{1,2}, Ouk-Martin C^{1,2,3}, Gachard N^{1,2}, Zimmer-Strobl U⁴, Feuillard J^{1,2}, Faumont N^{5,2}.

¹ CNRS-UMR 7276, University of Limoges, France.

² Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, France.

³ Platform of Cytometry and Imagery (CIM), University of Limoges, France.

⁴ Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany.

⁵ CNRS-UMR 7276, University of Limoges, France nathalie.faumont@unilim.fr.

Haematologica. 2017 May;102(5):883-894. doi: 10.3324/haematol.2016.156281. Epub 2017 Feb 23.



c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- κ B activated B cells

Amandine David,^{1,2*} Nicolas Arnaud,^{1,2*} Magali Fradet,^{1,2} H el ene Lascaux,^{1,2} Catherine Ouk-Martin,^{1,2,3} Nathalie Gachard,^{1,2} Ursula Zimmer-Strobl,⁴ Jean Feuillard,^{1,2} and Nathalie Faumont^{1,2}

¹CNRS-UMR 7276, University of Limoges, France; ²Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, France; ³Platform of Cytometry and Imagery (CIM), University of Limoges, France and ⁴Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany

*AD and NA contributed equally to this work.



Haematologica 2017
Volume 102(5):883-894

ABSTRACT

While c-Myc dysregulation is constantly associated with highly proliferating B-cell tumors, nuclear factor (NF)- κ B addiction is found in indolent lymphomas as well as diffuse large B-cell lymphomas, either with an activated B-cell like phenotype or associated with the Epstein-Barr virus. We raised the question of the effect of c-Myc in B cells with NF- κ B activated by three different inducers: Epstein-Barr virus-latency III program, TLR9 and CD40. Induction of c-Myc overexpression increased proliferation of Epstein-Barr virus-latency III immortalized B cells, an effect that was dependent on NF- κ B. Results from transcriptional signatures and functional studies showed that c-Myc overexpression increased Epstein-Barr virus-latency III-driven proliferation depending on NF- κ B. *In vitro*, induction of c-Myc increased proliferation of B cells with TLR9-dependant activation of MyD88, with decreased apoptosis. In the transgenic λ c-Myc mouse model with c-Myc overexpression in B cells, *in vivo* activation of MyD88 by TLR9 induced splenomegaly related to an increased synthesis phase (S-phase) entry of B cells. Transgenic mice with both continuous CD40 signaling in B cells and the λ c-Myc transgene developed very aggressive lymphomas with characteristics of activated diffuse large B-cell lymphomas. The main characteristic gene expression profile signatures of these tumors were those of proliferation and energetic metabolism. These results suggest that c-Myc is an NF- κ B co-transforming event in aggressive lymphomas with an activated phenotype, activated B-cell like diffuse large B-cell lymphomas. This would explain why NF- κ B is associated with both indolent and aggressive lymphomas, and opens new perspectives on the possibility of combinatory therapies targeting both the c-Myc proliferating program and NF- κ B activation pathways in diffuse large B-cell lymphomas.

Introduction

NF- κ B associated aggressive B-cell lymphomas can be subdivided into at least two main categories: diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) of immunocompetent patients with an activated B-cell-like (ABC) gene expression signature, and Epstein-Barr virus (EBV) associated DLBCLs, either in elderly or immunocompromised patients. ABC-DLBCLs exhibit an NF- κ B addiction and have a worse prognosis when compared to DLBCLs with a germinal center B-cell-like (GCB) signature, the other main molecular DLBCL subtype.¹ In ABC-DLBCLs, activation of NF- κ B is due either to autoactivation of the CD40 signalosome² or to NF- κ B activating mutations, among them mutations of *TNFAIP3* (A20) or *MYD88* (the most frequent, concerning 39% of ABC-DLBCLs).³ Prognosis of EBV-associated DLBCLs of the elderly who have an ABC-DLBCL profile is poor.^{4,5} In these cases, NF- κ B acti-

Correspondence:

nathalie.faumont@unilim.fr

Received: September 8, 2016.

Accepted: February 21, 2017.

Pre-published: February 23, 2017.

doi:10.3324/haematol.2016.156281

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/5/883

 2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



vation is due to the expression of the latent membrane protein 1 (LMP1), the main oncoprotein of EBV. NF- κ B inhibition in these tumors induces apoptosis.^{5,6} Immunodeficient patients are also prone to aggressive B-cell lymphoproliferative disorders, which are often associated with EBV and inhibition of NF- κ B leading to apoptosis of tumor cells.⁷⁻¹⁰

The activated B-cell phenotype of all these aggressive B-cell lymphomas is largely due to NF- κ B activation. These tumors also exhibit a high proliferative index,¹¹ likely due to the dysregulation of c-Myc activity.¹² Genetic alterations of *MYC*, although more frequent in GCB-DLBCLs, are also found in ABC-DLBCL, and c-Myc overexpression is a negative predictor of survival in both ABC and GCB-DLBCLs.¹³ In EBV-positive DLBCLs, Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) expression is a poor prognosis factor.¹⁴ By subverting the Notch pathway through targeting of the RBP-J κ nuclear factor, EBNA2 is the EBV protein responsible for the EBV-latency III program (also called proliferating program)¹⁵ and directly upregulates *LMP1* gene expression, which in turns activates NF- κ B.¹⁶ EBNA2 itself directly contributes to protection against apoptosis.^{15,17} EBNA2 is also responsible for c-Myc deregulation.¹⁸ *In vitro*, EBV-driven B-cell proliferation is directly related to the activity of two master transcription factors: c-Myc and NF- κ B.¹⁹

c-Myc is the master transcription factor for cell proliferation and is involved in numerous hematological and solid cancers.²⁰ Several transgenic mice models, including μ -Myc, λ -c-Myc or 3'RR-c-Myc models²¹⁻²³ as well as Burkitt's lymphomas (BLs) demonstrate that c-Myc overexpression in B cells leads to the emergence of aggressive B-cell lymphomas, but with a non-activated phenotype.

Based on these features, we raised the question concerning the effect of c-Myc overexpression in B cells with an NF- κ B activated B-cell-like phenotype. We showed that c-Myc constantly promoted B-cell proliferation of NF- κ B activated B cells in different models depending either on EBV, MyD88 or CD40, *in vitro* and *in vivo*. Co-regulation of c-Myc and CD40 in a mouse model led to very aggressive B-cell lymphomas with an activated phenotype.

Methods

See the *Online Supplementary Materials and Methods* for a description of the techniques.

Cells

ERE2.5 cells are a non-classical LCL with an estradiol inducible EBV-latency III proliferation program.²⁴ The P493.6 cell line is an ERE2.5 derivative transfected with a Tet-Off inducible c-Myc expressing vector.²⁵

EMSAs, Plasmid Constructs, Western Blotting and RT-PCR

Methods for nuclear extracts, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), Western blots and reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs) are described elsewhere.²⁶ Complementary DNA for I κ B α S^{32,36}A (super-repressor form of I κ B α) has already been published.²⁷

Cell Labeling, proliferation and immunohistochemistry

Red blood cell lysis buffer came from eBioscience, San Diego, CA, USA. To assess proliferation, carboxyfluorescein diacetate

succinimidyl ester (CFSE) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) were both obtained from Life Technologies, while 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) came from Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA. Ki-67 labeling was also used to follow proliferation using imaging flow cytometry with the ImageStream 100 apparatus (Amnis®; Merck, Darmstadt, Germany).

Gene Expression Profiling

Amplification of ribonucleic acids (RNAs) and hybridization onto microarrays were performed on an Affymetrix GeneAtlas® System with: Affymetrix® Human Genome U219 Array Strip, and Affymetrix® Mouse Gene 2.1 ST Array Strip as previously described.²⁶

Mouse Models

Information on λ -c-Myc mice and mice with the CD19-Cre conditional LMP1.CD40 fusion transgene have already been published.^{22,28} All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number: 87-022 and French ethics committee registration number "CREAL": 09-07-2012).

Results

c-Myc increases NF- κ B dependant EBV-latency III B-cell proliferation

c-Myc and NF- κ B are the two master transcriptional factors of EBV-latency III proliferating B cells.¹⁹ To understand how c-Myc interferes with the EBV-latency III proliferation program, we used the EBV-infected P493.6 B-cell line, a cell line that is double conditional for c-Myc and EBNA2, allowing for growth under the c-Myc or EBV-latency III program.²⁵ Indeed, P493.6 cells are thought to be an *in vitro* model of normal B cells that can be forced to adopt four different proliferation statuses: quiescent state (c-Myc-/EBNA2-), EBV-latency III proliferating program (c-Myc-/EBNA2+), BL-like c-Myc proliferating program (c-Myc+/EBNA2-), and both programs (c-Myc+/EBNA2+) (see the *Online Supplementary Figure S1* and its legend for a detailed description of this model).

We first analyzed transcriptional changes induced by EBV-latency III when associated with c-Myc overexpression. Supervised analysis led to the selection of 1,648 probes with at least a two-fold signal variation in one of the four P493.6 cell conditions when compared to the median of each probe. Genes could be grouped into five clusters by hierarchical clustering. Their main relevant biological functions are shown in Figure 1 (see also *Online Supplementary Table S1*). Cluster 1 corresponds to genes that were strongly repressed when both EBV-latency III and c-Myc programs were induced (c-Myc+/EBNA2+). Most genes were associated with immune response and the induction of apoptosis. Cluster 2 genes (such as *CD80*, *CFLAR/c-Flip*, *TRAF1*, *EBI3*, and *TNFAIP3/A20*) were induced by the EBV-latency III program alone (c-Myc-/EBNA2+), these genes are known to be NF- κ B targets. These genes were repressed by c-Myc (compare c-Myc+/EBNA2- and c-Myc-/EBNA2+ conditions) but were still expressed in the presence of both proliferating programs. Genes belonging to cluster 3 were likely to be targets of signaling pathways repressed by c-Myc in the presence or absence of EBV-latency III (c-Myc+/EBNA2+ and c-Myc+/EBNA2-). These signaling pathways included interferon, JAK/STAT, NF- κ B, Jun, Erk, and Akt pathways.

The last two clusters (clusters 4 and 5) were genes induced either by EBV-latency III (c-Myc+/EBNA2+) or c-Myc (c-Myc+/EBNA2-) programs alone for which expression was over-induced when both programs were switched on (c-Myc+/EBNA2+). The functions of these genes were nucleic acid metabolic processes, energy metabolism, and proliferation.

We subsequently studied the functional consequences of co-activation of both EBV-latency III and c-Myc programs. Induction of c-Myc by tetracycline retrieval increased proliferation of EBV-latency III P493.6 cells in a dose-dependent manner, reaching 45% with 1 μM estradiol (c-Myc+/EBNA2+) compared to 29% and 37% with

EBV-latency III or c-Myc alone, respectively (Figure 2A). Using an imaging flow cytometer, the strongest labeling of the Ki-67 proliferation marker was observed when both proliferation programs were induced (Figure 2B-D). Morphological evaluation of apoptotic cells by quantification of nuclear fragmentation²⁹ revealed that, as expected, induction of the EBV-latency III program increased protection against apoptosis and that induction of c-Myc alone was not deleterious in this cell type, as reported by Schuhmacher *et al.*³⁰ (Figure 2E). These results suggest that proliferation was increased when c-Myc overexpression was associated with the EBV-latency III program (c-Myc+/EBNA2+), maintaining protection from apoptosis.

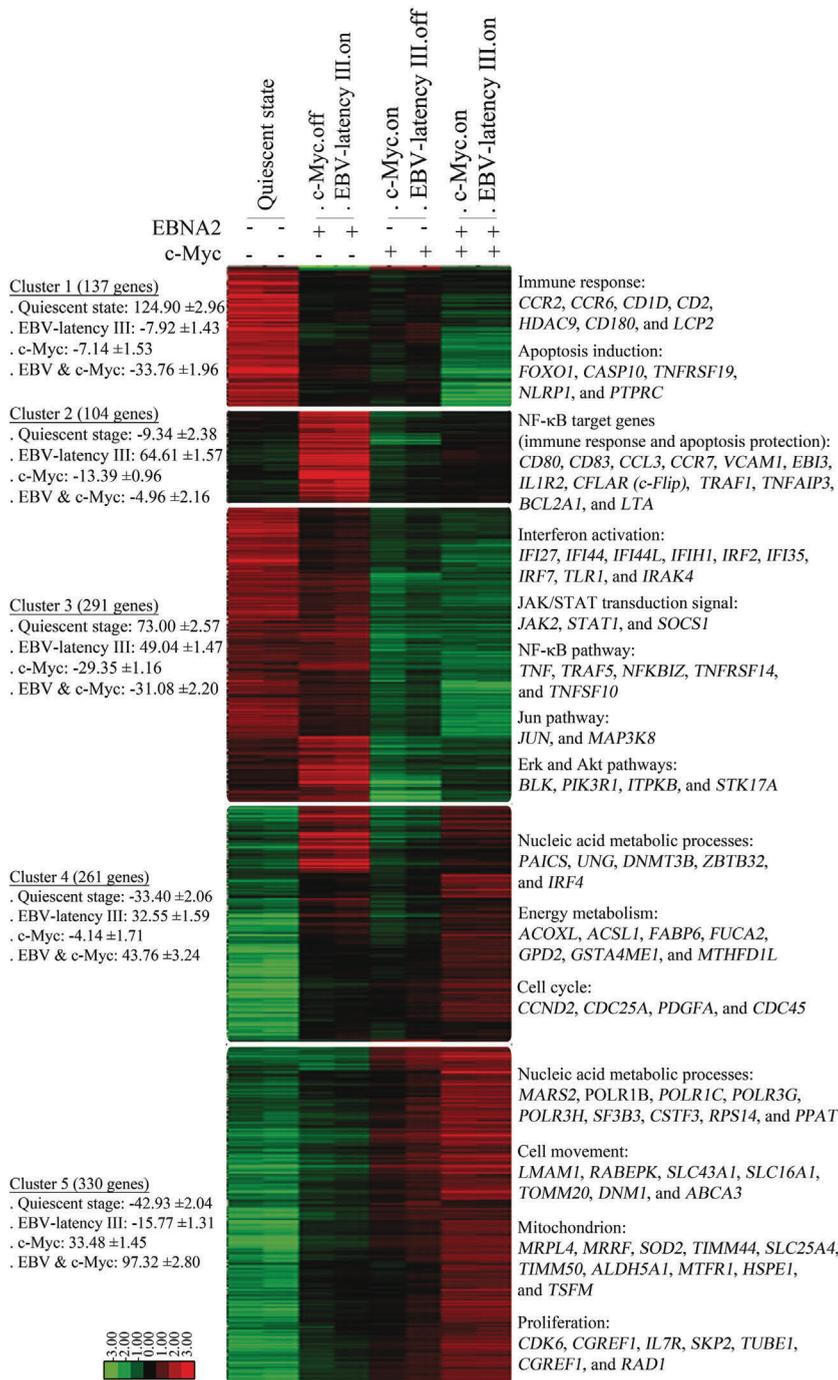


Figure 1. Transcriptomic changes induced by c-Myc overexpression on EBV-latency III proliferating P493.6 cells. Gene expression profiles of P493.6 cells induced (+) or not (-) for EBNA2 and/or c-Myc for 48 hours. Each cell condition was repeated once. Selection of the 1,648 probes was based on at least a two-fold variation in one of the four cell conditions when compared to the median. After ascending hierarchical clustering on median centered values, five main clusters were defined as the five ultimate ascending clusters with a global positive correlation value. For each cluster and each cell condition, centered means of gene expression values with standard errors (±SE) are indicated on the left. Most representative functions with most significant genes are mentioned on the right. Log2 value color codes are shown beside the heat map. EBNA2: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2; EBV: Epstein-Barr virus; NF-κB: nuclear factor-κB.

Since P493-6 cells could have been selected to resist the potential deleterious effect of c-Myc overexpression, we also transfected two classical LCLs, named PRI and JEF, with a doxycycline-inducible PRT-1 vector overexpressing c-Myc.³¹ Results suggest that mild induction of c-Myc increased proliferation of both classical LCLs while, as a control, proliferation of these cells was stable over luciferase induction levels (*data not shown*).

Altogether, the results presented suggest that both EBV-latency III and c-Myc programs brought complementary advantages for cell transformation, both acting concomitantly on cell proliferation and cell metabolism, with EBV-latency III acting more specifically on protection against apoptosis and c-Myc on repression of interferon response genes.

Albeit in a less intense manner than in EBV-latency III proliferating cells, NF- κ B was clearly activated in c-Myc+/EBNA2+ P493.6 cells when compared to c-Myc+/EBNA2- cells (see the *Online Supplementary Figure*

S2 for details on NF- κ B activation in the P493.6 cell line). We thus tested the effect of NF- κ B inhibition on these cells. NF- κ B was first repressed by overexpression of the super-repressor I κ B α S^{32,36A}.²⁷ Inhibition of NF- κ B decreased cell proliferation regardless of whether c-Myc was induced or not in EBV-latency III proliferating P493.6 cells (Figure 3A). The percentage of sub-G1 cells also increased after NF- κ B inhibition (*data not shown*). We also treated cells with PHA-408 (Figure 3B,C), an inhibitor of the I κ B kinase 2 (IKK2) subunit of the IKK complex.³² PHA-408 significantly decreased NF- κ B DNA binding activity when the EBV-latency III program was switched on (*Online Supplementary Figure S3*; Figure 3B: lanes 1, 5, 9 in the presence of c-Myc, and lanes 3, 7, 11 in the absence of c-Myc). In the presence of PHA-408, P493.6 proliferation driven by both EBV-latency III plus c-Myc programs was similar to that of cells driven by c-Myc alone. As control, the addition of PHA-408 marginally affected proliferation of P493.6 cells when c-Myc alone was turned on

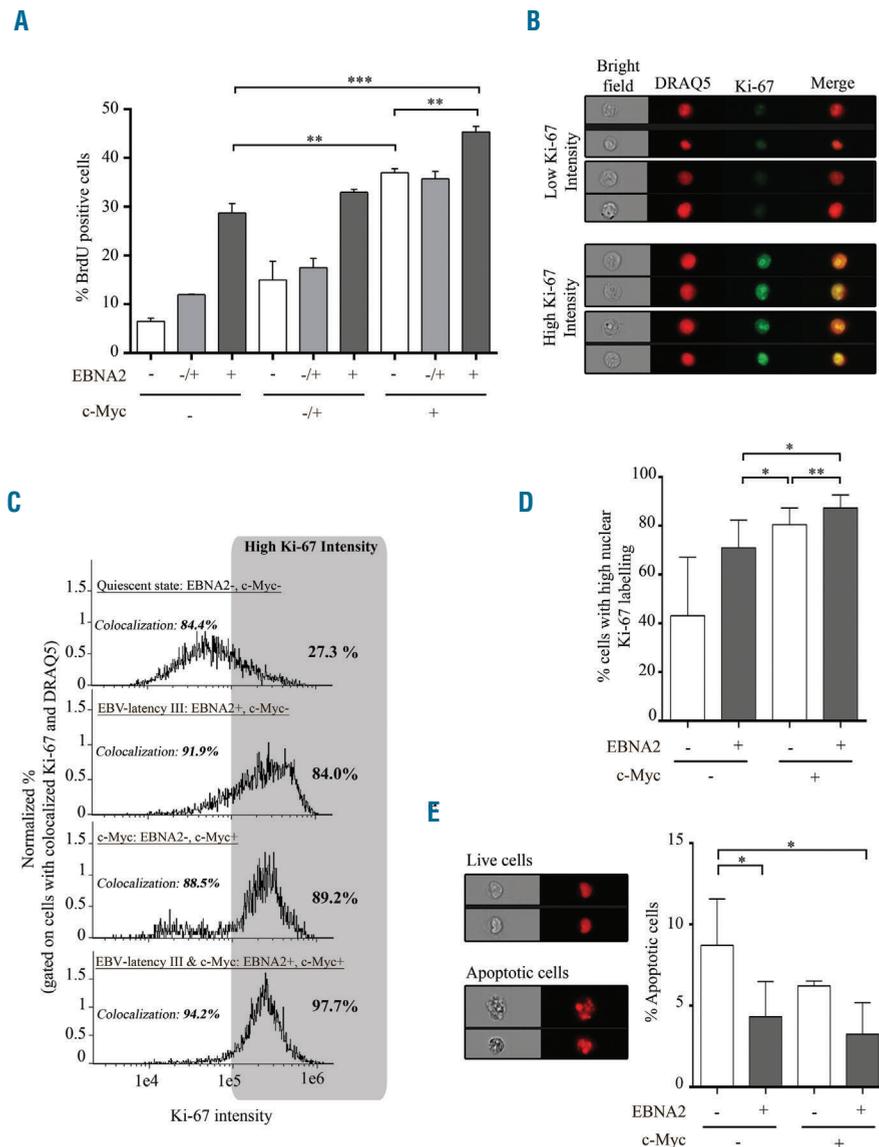


Figure 2. Proliferation and apoptosis of P493.6 cells after induction of c-Myc programs in EBV-latency III B cells. (A) Percentage of BrdU positive cells was assessed by flow cytometry on P493.6 cells treated with two doses of estradiol (0.1 μ M: EBNA2-/+ and 1 μ M: EBNA2+) or not (EBNA2-) and/or with tetracycline (100 μ g/ml: c-Myc-; 3 μ g/ml: c-Myc-/+; and not: c-Myc+) for 48 hours. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=3 independent experiments). (B to E) P493.6 cells were treated or not with 1 μ M estradiol and/or 100 μ g/ml tetracycline for 48 hours to induce either cell quiescence (EBNA2-, c-Myc-), EBV-latency III alone (EBV+, c-Myc-), c-Myc alone (EBNA2-, c-Myc+), and both c-Myc and EBV-latency III (EBNA2+, c-Myc+). (B,C and D) Percentage of cells with strong staining of the Ki-67 proliferation marker in the nucleus, assessed by imaging flow cytometry. (B) Examples of cells under the c-Myc program with low or high Ki-67 expression. Selection of cells was based on colocalization of Ki-67 and the DRAQ5 \oplus nuclear dye. (C) Representative monoparametric histograms of Ki-67 intensity gated on cells with colocalization of Ki-67 and DRAQ5 \oplus . Each cell condition is indicated at the top left of each histogram. Threshold for strong Ki-67 labeling is indicated by the gray box. Percentage of cells with high Ki-67 labeling is indicated on the top right of each histogram. (D) Total percentage of high nuclear stained Ki-67 cells in the four culture conditions of P493.6 cells. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=5 independent experiments). (E) Apoptosis of the uncolocalized Ki-67 and DRAQ5 \oplus population using imaging flow cytometry. Left panel: example of living and apoptotic cells under the c-Myc condition. Right panel: total percentage of apoptotic cells in the four culture conditions. Quantification was based on morphometric parameters.²⁹ Data are shown as mean \pm standard deviation (n=3 independent experiments). Statistical significance was determined by Student's t-test (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; EBNA2: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2; EBV: Epstein-Barr virus; DRAQ5: deep red anthraquinone 5.

(Figure 3C). This suggests that when both c-Myc and the EBV-latency III program were induced, increased proliferation was mainly due to both c-Myc and NF-κB.

C-Myc increases TLR9 induced B-cell proliferation both *in vitro* and *in vivo*

Since activating mutations of MyD88 are frequently found in aggressive B-cell lymphomas with activation of NF-κB,³⁵ we decided to assay the effect of both c-Myc and TLR9 activation in B cells. *In vitro*, resting P493.6 cells (c-Myc-/EBNA2-) were stimulated with or without either short control oligodeoxynucleotides (ODN-ctl) or with unmethylated CpG motifs (ODN-CpG). TLR9 activation moderately but significantly increased the S-phase entry of resting P493.6 cells (Figure 4A). c-Myc induction

(c-Myc+/EBNA2-) led to a considerable acceleration of cell proliferation; an effect that was further enhanced on TLR9 activated cells (Figure 4A). As expected, NF-κB targets, such as TRAF1, were upregulated upon ODN-CpG treatment (Figure 4B). When NF-κB was inhibited after the addition of PHA-408, as shown by inhibition of TRAF1 expression, a significant decrease in TLR9 activated B-cell proliferation was seen. This shows that enhanced proliferation of TLR9 activated P493.6 cells with c-Myc overexpression was dependent on NF-κB. This proliferative effect of TLR9 stimulation was confirmed in c-Myc overexpressing BL2 and BL41 BL cell lines (*data not shown*).

We used the λc-Myc mice published by Kovalchuk *et al.*²² carrying an insertion of a translocated MYC gene cloned from the human BL60 cell line in order to investi-

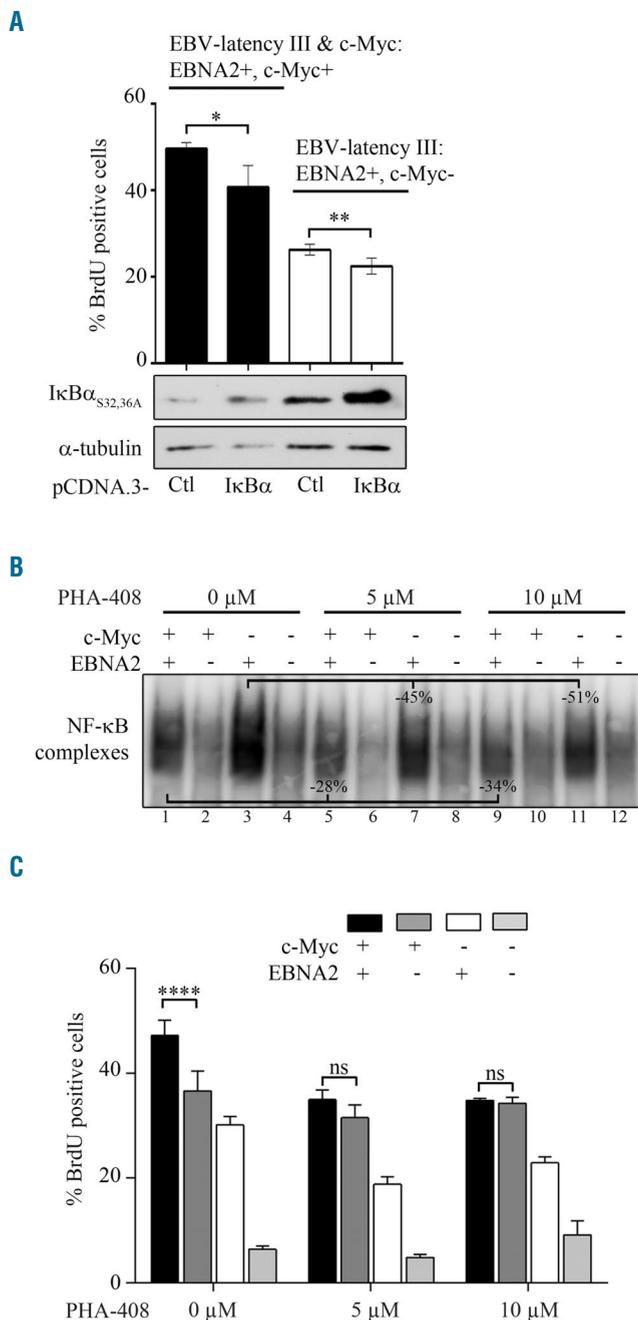


Figure 3. Activation of NF-κB in P493.6 cells after induction of c-Myc on EBV-latency III. P493.6 cells were treated or not with estradiol 1 μM (EBNA2- or EBNA2+) and/or with tetracycline at 100 ng/mL (c-Myc+ or c-Myc-) for 48 hours. (A) Percentage of BrdU positive cells after transient transfection with the pCDNA.3 empty vector (Ctl) or expressing the super-repressor IκBα^{S32,36A} for 48 hours (upper panel). Representative analysis of IκBα^{S32,36A}, and α-tubulin expression by Western blot (lower panel). (B and C) Effect of the IKK2 inhibitor PHA-408 (5 μM and 10 μM) for 48 hours on NF-κB. Representative DNA binding by EMSA (panel B) and BrdU incorporation (panel C). In the histograms, data are shown as the mean ± standard deviation (at least 3 independent experiments). Statistical significance was determined by Student's t-test (****P<0.001; **P<0.01; *P<0.05). ns: not significant; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; EBNA2: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2; EBV: Epstein-Barr virus; Ctl: control; NF-κB: nuclear factor-κB.

gate the cooperation of c-Myc overexpression and TLR9 signaling *in vivo*. As reported, all λ c-Myc mice developed high grade B-cell lymphomas with similarities to BL, and median survival was 14 weeks (*Online Supplementary Figure S4A*). At pre-tumor stage (5-6-week old) mice had increased spleen weight, white blood cell count, and percentage of activated CD86 positive B cells, but without affecting the percentage of total B cells in the spleen (*Online Supplementary Figure S4B,C*). TLR9 stimulation with ODN-CpG led to strong NF- κ B activation in splenocytes from both λ c-Myc and wild-type (wt) mice (*Online Supplementary Figure S5A*). *In vivo* repeated ODN-CpG intraperitoneal injections induced a significant increase in spleen size and weight in both wt and λ c-Myc mice

(Figure 5A,B). This splenomegaly was much higher for half of the ODN-CpG injected λ c-Myc mice when compared to the wt mice which were also stimulated: 361.3 ± 49.7 mg vs. 216.9 ± 14.5 mg ($P = 0.0043$). *In vivo*, ODN-CpG injection induced proliferation of B cells in spleens from both wt and λ c-Myc mice. This increased proliferation was higher in ODN-CpG injected λ c-Myc mice (Figure 5C). Similar results were obtained from lymph node B cells of the same mice (*data not shown*).

To eliminate an indirect proliferating effect on ODN-CpG on B cells *via* stimulation of the microenvironment, *ex vivo* ODN-CpG stimulations of total splenocytes were done. TLR9 stimulation induced a significant increase in proliferation and viability of λ c-Myc splenocytes when

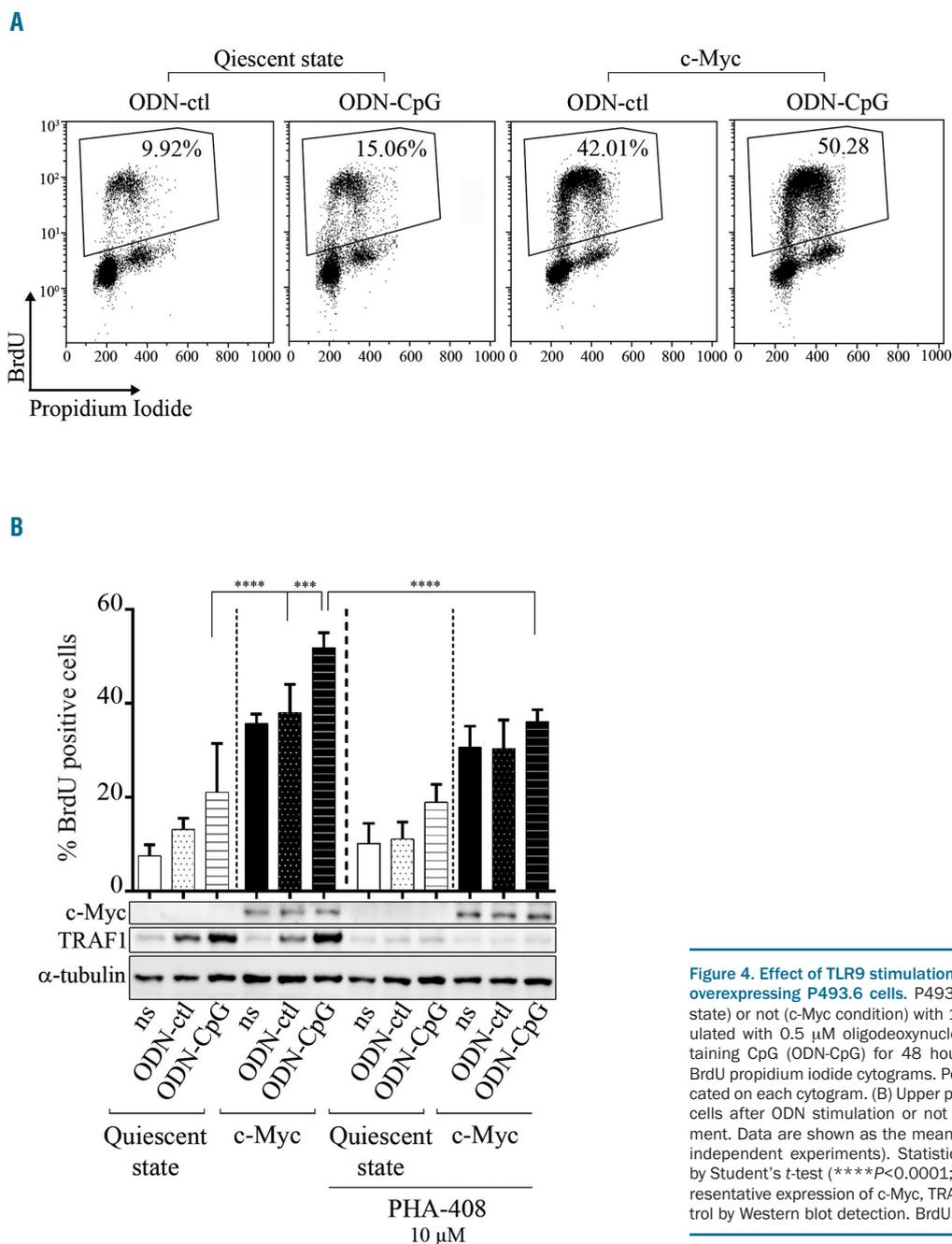


Figure 4. Effect of TLR9 stimulation and NF- κ B implication on c-Myc overexpressing P493.6 cells. P493.6 cells were treated (quiescent state) or not (c-Myc condition) with 100 ng/mL tetracycline and stimulated with 0.5 μ M oligodeoxynucleotides control (ODN-ctrl) or containing CpG (ODN-CpG) for 48 hours. (A) Representative bivariate BrdU propidium iodide cytograms. Percentage of S-phase cells is indicated on each cytogram. (B) Upper panel: percentage of BrdU positive cells after ODN stimulation or not (ns) and 10 μ M PHA-408 treatment. Data are shown as the mean \pm standard deviation (at least 4 independent experiments). Statistical significance was determined by Student's t-test (**** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$). Lower panel: representative expression of c-Myc, TRAF1 and α -Tubulin as loading control by Western blot detection. BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine.

compared to wt cells (*Online Supplementary Figure S5B,C*). B-cell labeling after EdU incorporation showed that proliferating splenocytes belonged to the B-cell fraction with a higher proliferation when B cells were from λc-Myc spleens (Figure 5D). Cell growth assay and Ki-67 labeling on sorted B-cell subsets showed that this increased proliferation was mainly due to follicular (CD23-high, CD21-low) and marginal zone (CD23-low, CD21-high) B cells (Figure 5E,F). These data show that *in vivo* MYC/IG translocation with c-Myc overexpression provided an additional signal driving a stronger proliferation and survival of TLR9 activated B cells.

In vivo dysregulation of both CD40 signaling and c-Myc leads to aggressive diffuse large B-cell lymphoma with an activated phenotype

To assess the role of c-Myc in an *in vivo* model of NF-κB dependent B-cell lymphoma, we crossbred λc-Myc with

L.CD40 transgenic mice (L.CD40/λc-Myc transgenic mice). L.CD40 mice are characterized by surface membrane expression of a chimeric LMP1/CD40 protein in CD19 positive B cells, resulting in a constitutively active CD40 signal in the B-cell lineage with constitutive activation of the NF-κB pathway as well as the mitogen-activated protein kinases Jnk and extracellular signal-regulated kinase.²⁸ In these mice, deregulated CD40 signaling induces the development of indolent splenic B-cell lymphomas with an increase in the marginal zone B-cell compartment in more than 60% of mice older than 1 year.

Spleen size and weight were much higher in L.CD40/λc-Myc transgenic mice when compared to control mice (wt, L.CD40, and λc-Myc mice) (Figure 6A,B). L.CD40/λc-Myc mice prematurely developed enlarged lymph nodes at 10±2 weeks (*vs.* 12±3 weeks for λc-Myc mice). In contrast, lymph nodes were not enlarged in L.CD40 and wt mice (Figure 6B). If percentages of CD80

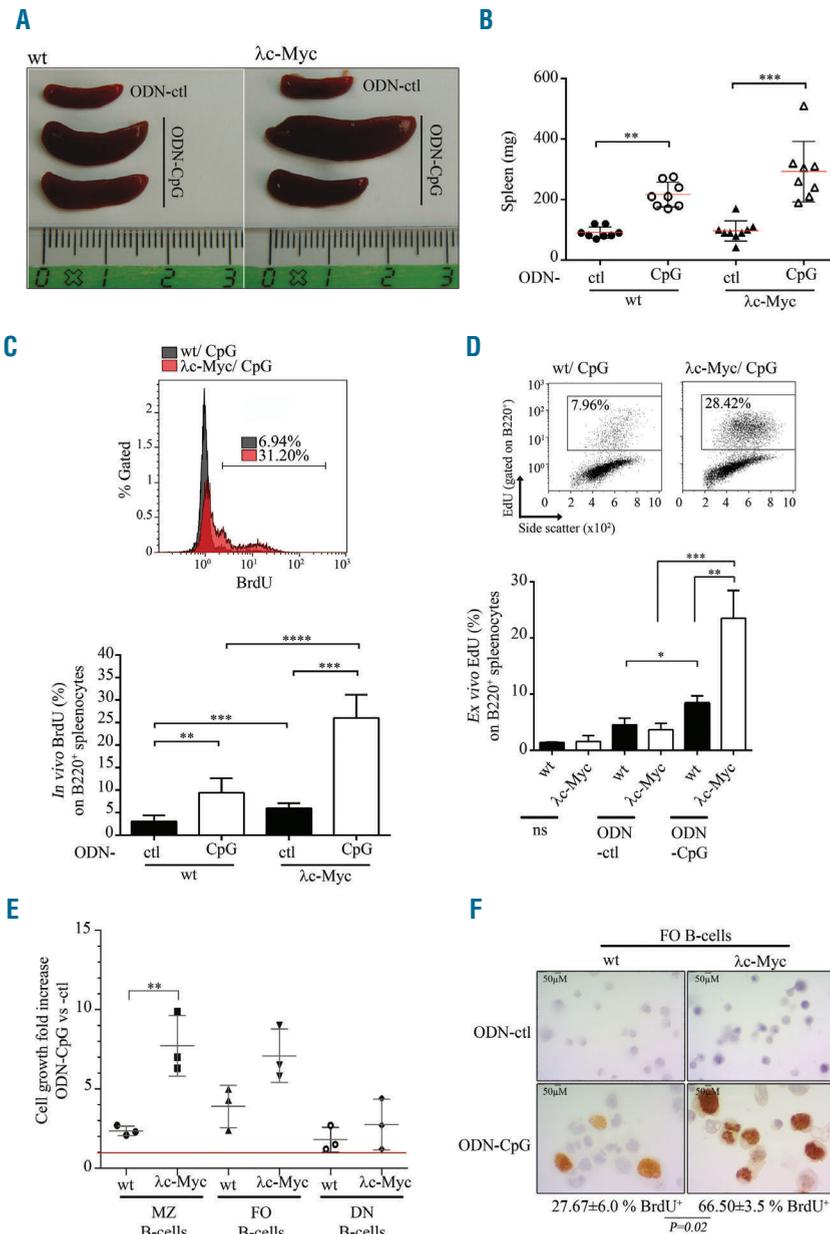


Figure 5. Effect of TLR9 stimulation on B cells from 4-5-week old λc-Myc (pre-tumor stage) and wild-type (wt) mice. *In vivo* stimulation with control (ODN-ctl) or CpG containing (ODN-CpG) oligodeoxynucleotides: 10-fold 50 μg ODN intraperitoneal injection every two days. Representative spleen size (A) and scatter plot from spleen weight (B). B220 positive splenocyte proliferation after *in vivo* BrdU incorporation for about 24 hours (C): upper panel, overlay of representative BrdU labeling histograms gated on B220 positive cells from ODN-CpG injected λc-Myc and wt mice; and lower panel, mean of *in vivo* BrdU percentage on B220 positive splenocytes. Data are shown as mean ± standard deviation (n=6 mice in each experiment group). (D) Total splenocytes were *ex vivo* stimulated or not (ns) with control (ODN-ctl) or CpG containing motif (ODN-CpG) oligodeoxynucleotides. Proliferation at day 4 was assessed by EdU incorporation and labeling of B220 positive splenocytes. Upper panel: representative biparametric EdU side scatter cytograms gated on B220 positive cells. Percentages of EdU⁺ and B220⁺ cells are indicated in each graph. Lower panel: mean percentages of EdU⁺ and B220⁺ cells. Data are shown as mean ± standard deviation (n=4 mice in each experiment group). (E) Cell growth of marginal zone (MZ), follicular (FO) and double negative (DN) spleen B cells sorted from wt and λc-Myc mice. Cells were counted by Trypan blue staining exclusion after 4 days stimulation. Red line indicates no cell growth fold increase in ODN-CpG condition *versus* ODN-ctl condition (value = 1). Data are shown as mean ± standard deviation (n=3 mice in each experiment group). (F) BrdU labeling of sorted FO B cells from wt (left panels) and λc-Myc mice (right panels) treated (CpG, lower panels) or not (ctl, upper panels) with CpG oligonucleotides for 4 days. BrdU incorporation was performed 4 hours before cells were cytoцентрифугed. No BrdU incorporation was detectable in ctl conditions (upper panels). Mean and standard deviation of percentages of BrdU positive CpG treated cells are indicated (n=3 mice in each experiment group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (****P*<0.0001; ***P*<0.001; **P*<0.01; **P*<0.05). EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine.

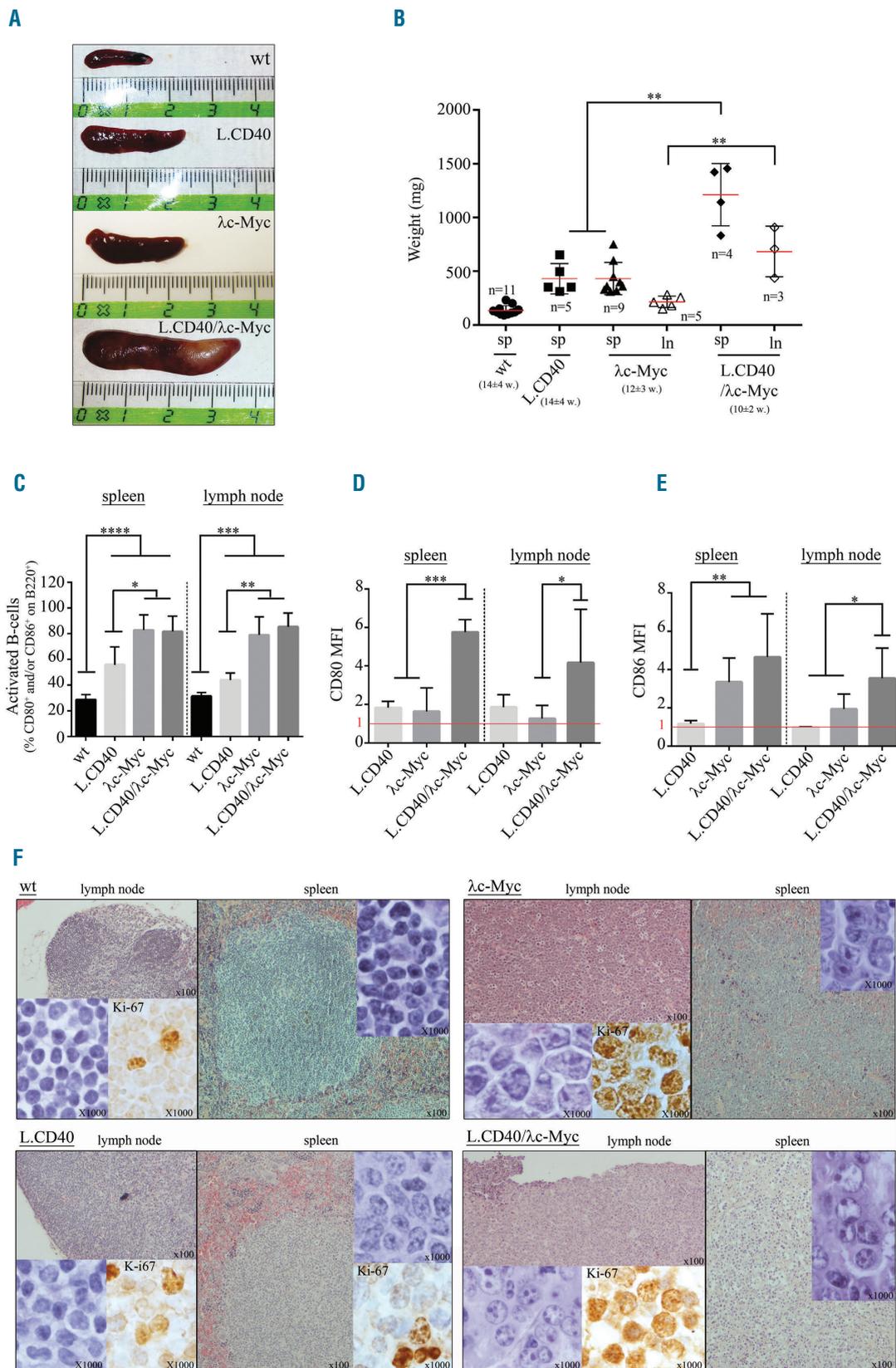


Figure 6. Phenotypic analysis of L.CD40/λc-Myc mice compared to wild-type (wt), L.CD40, and λc-Myc control mice. (A) Representative spleen size. (B) Scatter-plot of spleen (sp) and lymph node (ln) weights. For each group, number (n) and mean age of mice (w, week) are indicated. Data are shown as mean ± standard deviation (n=3-11 mice in each experiment group). Statistical significance was determined by Student's t-test (** $P < 0.01$). (C, D, and E) B220, CD80, and CD86 labeling from total splenocytes and lymph node cells. Histograms of activated B-cell percentages on B220⁺ cells i.e., percentage of CD80⁺ and/or CD86⁺ cells (C), mean fluorescent intensity (MFI) of CD80 (D) and CD86 (E) on B220 positive cells. MFI was normalized from wt mice (MFI=1 in red). Data are shown as mean ± standard deviation (n=3-11 mice in each experiment group). Statistical significance was determined by Student's t-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). (F) H&E and Ki-67 staining on lymph node and spleen sections.

or CD86 activated B cells were increased in a comparable manner in both λc-Myc and L.CD40/λc-Myc mice (Figure 6C), CD80 and CD86 mean fluorescent intensities on B cells were significantly increased in L.CD40/λc-Myc mice compared to λc-Myc mice, both in spleen and lymph nodes (Figure 6D,E). The viability of splenocytes after

three days culture in complete medium without stimulation indicated that protection against cell death was increased in L.CD40/λc-Myc tumor cells when compared to other conditions (Online Supplementary Figure S6). In both λc-Myc and L.CD40/λc-Myc mice, lymphoid tissue architecture was lost with a massive tumor infiltration,

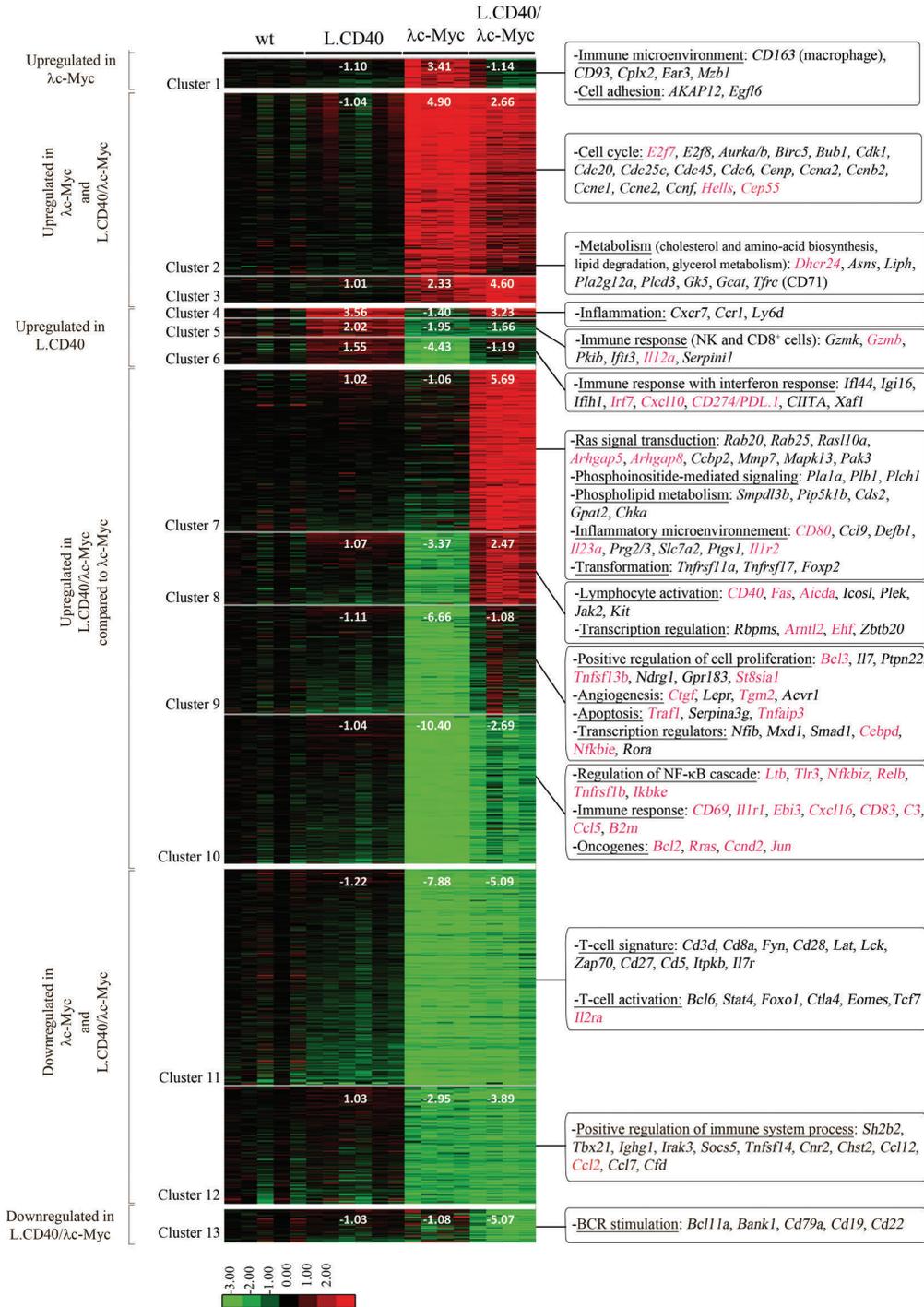


Figure 7. Gene expression profile of L.CD40/λc-Myc tumors compared to λc-Myc mice tumors. Supervised analysis led to the selection of 2,437 significant probes, which were initially partitioned into 30 clusters by K-means clustering so that the number of probes was above 15. The closest groups were merged 2 by 2 according to their proximity by hierarchical clustering and principal component analysis of the mean vectors. This was repeated until maximization of the absolute value of χ^2 .¹⁹ The final resulting number of clusters was 13 (Cluster 1 to 13). For each cluster and each sample condition, fold change value compared to wild-type (wt) samples were calculated from the mean of gene expression values and are indicated on the heat map. Most representative functions with most significant genes are mentioned on the right. NF-κB target genes are indicated in red. Log₂ value color codes are shown beside the heat map. NF-κB: nuclear factor-κB; BCR: B-cell receptor.

and the Ki-67 proliferation index was high (>90%) (Figure 6F). Tumor lymph nodes from λ c-Myc histologically resembled BL with medium sized monomorphic tumor cells and the presence of numerous tingible body macrophages with apoptotic bodies giving a starry sky effect. In L.CD40/ λ c-Myc mice, lymphoma cells were highly atypical, being large and irregular, with abundant cytoplasm, large nuclei that possessed one to three or four prominent nucleoli usually located in the periphery of the nucleus, evoking the aspect of immunoblastic lymphomas according to the Bethesda classification of lymphoid neoplasms in mice³⁴ (Figure 6F), for which the human counterpart would be DLBCLs with an activated phenotype.

Taking wt mice as a reference, gene expression profiles of tumors from lymph node samples suggest that deregulated genes could be separated into thirteen clusters. These clusters were grouped into six categories: upregulated genes in λ c-Myc mice alone, in both λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc mice, in L.CD40 mice alone, in L.CD40/ λ c-Myc when compared to λ c-Myc mice, down-regulated genes in both λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc mice, and in L.CD40/ λ c-Myc mice alone (Figure 7, see also *Online Supplementary Table S2*). In agreement with the morphology, a specific macrophage signature was found in upregulated genes in λ c-Myc mice alone. Both λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc tumors had numerous upregulated genes involved in cell cycle regulation, such as *E2f7/8*, *Ccnp*, *Ccnb2* and *Ccne1/2*. Metabolism processes were also among the highly upregulated functions in both mice models. Genes whose expression was increased in L.CD40 mice alone include those of the CD8 cytotoxic T cells and natural killer cells response, as well as those of the inflammatory and interferon response. This is in agreement with the original publication reporting an activated T-cell phenotype in these mice.²⁸ In the meantime, expression of the immunosuppressive CD274/PDL1 was increased in L.CD40 mice. CD274/PDL1 was also increased in L.CD40/ λ c-Myc when compared to λ c-Myc mice. Among over-expressed genes in L.CD40/ λ c-Myc compared to λ c-Myc mice, the main represented biological functions were inflammation, transformation, cell activation, angiogenesis, transcription regulators, and NF- κ B regulators such as *Ltb*, *Thr3*, *CD40*, *RelB*, and *Traf1*. CD40 expression was increased in both L.CD40 and L.CD40/ λ c-Myc mice. This could be due to expression of the L.CD40 transgene or to endogenous CD40 expression, since one of the three probe sets spanning CD40 partially matched the C-terminal CD40 moiety of the L.CD40 protein while the two others did not. NF- κ B target genes were induced in L.CD40/ λ c-Myc mice, including, for example, *CD80*, *Fas*, *Tnfrsf3*, *Bcl2*, *Ebi3* and *Cnd2*. Repression of interferon response was significantly attenuated in these double L.CD40/ λ c-Myc mice when compared to λ c-Myc mice, but was still present if compared to wt or L.CD40 mice. Genes coding for T-cell signature and T-cell activation markers were decreased in both λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc mice. Thus, as regards P493.6 cells in the c-Myc+/EBNA2+ condition, the main transcriptomic features of L.CD40/ λ c-Myc mice evoked increased proliferation, metabolism with apoptosis protection and attenuated interferon response as well as expression of the CD274/PDL1 molecule that inhibits the T-cell antitumor response. Moreover, expression of some B-cell markers such as CD79a, CD19 and CD22 was specifically decreased in L.CD40/ λ c-Myc. Even if lower CD19 expres-

sion could be the result of using CD19-Cre mice, its strongest decrease in L.CD40/ λ c-Myc mice together with the decrease of the B-cell receptor (BCR) associated CD22 molecule, of two BCR signaling molecules (CD79a and BANK1) as well as of a molecule normally expressed in germinal center B-cells (BCL11a), evokes features found in B cells with partial engagement in plasma cell differentiation.

These results suggest that c-Myc overexpression confers an aggressive DLBCL phenotype with a high proliferative index and an activated phenotype to L.CD40 activated B cells.

Discussion

EBV-positive DLBCLs of the elderly are characterized by prominent NF- κ B and JAK/STAT activation,^{4,35} able to upregulate c-Myc expression in ABC-DLBCLs.³⁶ B-cell lymphomas from HIV-infected patients very often have an ABC-DLBCL phenotype and are associated with *MYC/IGH* translocation.³⁷ In LCLs, blocking c-Myc directly arrests cell growth and survival.¹⁹ In our EBV-infected human cell lines, the addition of c-Myc clearly favored cell growth with increased proliferation and metabolism, meanwhile, genes involved in immune surveillance and/or the inflammatory or interferon response were repressed. Enforced MyD88-L252P expression by retroviral infection of E μ -Myc fetal liver cells dramatically shortened the time of tumor onset after transplantation in irradiated mice.³⁸ In agreement, our results show that activation of MyD88 by TLR9 stimulation increased cell growth both *in vitro* in human cell lines and *in vivo* in the λ c-Myc mouse model. c-Myc may play an important role in aggressive lymphomas with an activated phenotype related to NF- κ B.

It is a paradox that, as a primary event, NF- κ B activation is associated with both indolent and aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHL). For example, mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) indolent lymphomas frequently exhibit recurrent inactivating mutations of *A20/TNFAIP3* that results in continuous activation of the classical NF- κ B pathway, and these mutations are also found in ABC-DLBCLs.^{39,40} Waldenström macroglobulinemias are characterized by recurrent activating MyD88 mutations in 90% of cases, mainly MyD88-L265P, first described in ABC-DLBCLs,^{35,41,42} which again leads to the activation of NF- κ B. This could suggest that NF- κ B addiction in DLBCLs is associated with other genetic events that promote cell proliferation.

To our knowledge, only three mouse models for indolent lymphomas of the spleen have been published, one mimicking TRAF3 inactivation,⁴³ the second with constitutive expression of Bcl10,⁴⁴ and the last one with continuous CD40 signaling.²⁸ The three models are characterized by an increased activation of RelB (i.e., the NF- κ B alternative pathway), and B-cell lymphomas preferentially located in the spleen, with expansion of the marginal zone. B-TRAF3^{-/-} deficient mice developed lymphomas that have been reported to be either low or high grade and to diffuse into other lymphoid organs as well as the bone marrow.⁴⁵ Bcl10 transgenic mice were characterized by an expansion of marginal zone B cell due to lymphocyte accumulation, and some mice older than 8 months developed lymphoma resembling the human marginal zone lymphomas of the spleen.⁴⁴ The evolution of L.CD40

transgenic mice was characterized by a progressive increase in splenomegaly and considerable expansion of the spleen B-cell area with acquisition of monoclonality, but the proliferative index remained constantly low, with no evidence for transformation into high grade lymphoma.²⁸ Regarding the aggressive transformation of B cells in mice, Calado *et al.* reported that a mouse model with constitutive activation of IKK2 in B cells only developed plasma cell hyperplasia with a serum immunoglobulin peak.⁴⁵ Additional ablation of the *Blimp1/Prdm1* gene blocked plasma cell differentiation and led to the development of aggressive B-cell lymphomas resembling ABC-DLBCLs. Zhang *et al.* showed that *in vivo* enforced expression of NIK in germinal center B cells led to plasma cell hyperplasia, again without lymphoma. But the combination of NIK and *Bcl6* enforced expression led to the development of aggressive lymphomas resembling ABC-DLBCLs.⁴⁶ These results on animal models suggest that *in vivo* continuous NF- κ B activation would favor B cells, but other events, such as *Blimp1* inactivation or *Bcl6* dysregulation, seem to be needed for transformation into an aggressive DLBCL.

Both *BLIMP1* and *BCL6* are transcriptional repressors of the *MYC* gene.^{47,48} Consequently, *BLIMP1* disruption can cause increased c-Myc expression.²⁰ In DLBCLs tumor B cells become refractory to c-Myc repression by *BCL6*.⁴⁹ Furthermore, *BCL6* expression represses that of *BLIMP1*.⁴⁸ This suggests that *BCL6* may indirectly activate c-Myc transcription through repression of *BLIMP1* expression.²⁰ Thus, c-Myc could be the good endpoint target of various secondary events to then cooperate with NF- κ B to promote aggressive B-cell lymphomagenesis.

Contrasting with mice models with constitutive NF- κ B activation in B cells; all mice models with c-Myc overexpression in B cells develop aggressive B-cell tumors. For example, λ c-Myc mice had an early aggressive tumor onset primarily located in lymph nodes with secondary dissemination to the spleen.²² Morphology of these tumors evokes that of human BL, with a very high proliferative index. Our results show that double L.CD40/ λ c-Myc mice have very aggressive tumors with systemic dissemination to all lymphoid compartments of the organism. Immunoblastic morphology of these tumors evokes that of ABC-DLBCLs in humans, being completely different from that of both L.CD40 and λ c-Myc mice. These features can be viewed either as the c-Myc-driven transformation of a CD40-dependent indolent lymphoma, or as a shift from a c-Myc-driven aggressive B-cell lymphoma resembling human BL to an activated phenotype due to continuous CD40 activation. Functional studies clearly indicate cooperation between L.CD40 and λ c-Myc transgenes in B-cell transformation. This cooperation was also found at the gene expression level, with upregulated genes involved in transformation, cell activation, and angiogenesis, such as *Tnfrsf3*, *Rab20/25*, *CD40*, *Arntl2*, *Cigf*, *Bcl2*, *Rras*, *Ccnd2*, and *Jun*. Most of these genes are known to be NF- κ B targets.

λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc tumors were characterized by a marked decrease in the T-cell signature. This could be either due to massive infiltration of the tumor or to lack of immune control. The growth of c-Myc-driven tumors is rather likely to be independent of their immune microenvironment.⁵⁰ By contrast, escaping immune surveillance is clearly a key step for tumor emergence and/or tumor progression in DLBCLs.⁵⁰ As illustrated herein by our transcriptome results, Hömig-Hölzel *et al.* have previously shown that L.CD40 mice exhibited activating T-cell expansion.²⁸ However, CD274/PDL1 expression was found to be increased in L.CD40 tumors. Even if attenuated, such CD274/PDL1 expression was also increased in L.CD40/ λ c-Myc tumors when compared to those of λ c-Myc. Thus, combining the lack of T-cell signatures, including T-cell activation markers, with CD274/PDL1 expression by the tumor (a L.CD40 effect) and decreased interferon response (a c-Myc effect) in L.CD40/c-Myc mice could in part explain the aggressiveness of tumor growth, which is under a lesser degree of immune control. Therefore, c-Myc increased the tumor potency of NF- κ B activated B cells in terms of proliferation, protection against apoptosis and tumor aggressiveness.

In conclusion, we demonstrated that adding c-Myc to B cells with NF- κ B activated by either LMP1, TLR9 or CD40, constantly increased the proliferation potential of cells and/or the aggressiveness of the tumor both *in vitro* and in animal models. Furthermore, we showed that adding c-Myc to CD40 activation in mice transformed indolent into aggressive lymphomas with features of NF- κ B-activated cells. These results highlight the role of these two master transcriptional systems in B-cell lymphomagenesis, explaining why NF- κ B is associated with both indolent and aggressive lymphomas and opening new perspectives on the possibility of combinatory therapies targeting both the c-Myc proliferating program and NF- κ B activation pathways in DLBCLs.

Acknowledgments

We are especially grateful to Pr GW Bornkamm, Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany, for helping us to initiate the project and for continuous support and helpful discussions. We thank Dr A Marfak, Statistical Unit, IFCS, Rabat, Morocco, for transcriptome analysis. We thank Dr J Cook Moreau, UMR CNRS 7276, Limoges, France, for English editing.

Funding

The group of J Feuillard is supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue), the Institut National contre le Cancer (INCa), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the Limousin Region and the Haute Vienne and Corrèze comitees of the Ligue Nationale contre le Cancer and by the Lyons Club of Corrèze. U Zimmer Strobl was supported by the DFG grant: GZ: ZI 1382/4-1.

References

1. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1417–1429.
2. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, et al. A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF- κ B and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity.* 2002;16(1):37–50.
3. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(1):12–23.
4. Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive

- post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor- κ B activation. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2012;25(7):968-982.
5. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016;91(5):529-537.
 6. Bavi P, Uddin S, Bu R, et al. The biological and clinical impact of inhibition of NF- κ B-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *J Pathol.* 2011; 224(3):355-366.
 7. Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med.* 1998;338(20):1413-1421.
 8. Feuillard J, Schuhmacher M, Kohanna S, et al. Inducible loss of NF- κ B activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood.* 2000; 95(6):2068-2075.
 9. Zou P, Kawada J, Pesnicak L, Cohen JL. Bortezomib induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells and prolongs survival of mice inoculated with EBV-transformed B cells. *J Virol.* 2007; 81(18):10029-10036.
 10. Chao C, Silverberg MJ, Martínez-Maza O, et al. Epstein-Barr virus infection and expression of B-cell oncogenic markers in HIV-related diffuse large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18(17):4702-4712.
 11. Liu Y-H, Xu F-P, Zhuang H-G, et al. Clinicopathologic significance of immunophenotypic profiles related to germinal center and activation B-cell differentiation in diffuse large B-cell lymphoma from Chinese patients. *Hum Pathol.* 2008; 39(6):875-884.
 12. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;122(24):3884-3891.
 13. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica.* 2013;98(10):1554-1562.
 14. Stuhlmann-Laiesz C, Borchert A, Quintanilla-Martinez L, et al. In Europe expression of EBNA2 is associated with poor survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(1):39-44.
 15. Kohlhof H, Hampel F, Hoffmann R, et al. Notch1, Notch2, and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein-Barr virus-infected B cells. *Blood.* 2009;113(22):5506-5515.
 16. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(10):757-768.
 17. Lee JM, Lee K-H, Weidner M, Osborne BA, Hayward SD. Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(18):11878-11883.
 18. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 1999;73(5):4481-4484.
 19. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, et al. c-Myc and Rel/NF- κ B are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol.* 2009; 83(10):5014-5027.
 20. Wierstra I, Alves J. The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv Cancer Res.* 2008;99:113-333.
 21. Langdon WY, Harris AW, Cory S, Adams JM. The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell.* 1986 Oct 10;47(1):11-18.
 22. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, et al. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med.* 2000;192(8):1183-1190.
 23. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, et al. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol.* 2007;179(9):6033-6042.
 24. Kempkes B, Zimmer-Strobl U, Eissner G, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 2):227-237.
 25. Pajic A, Spitzkovsky D, Christoph B, et al. Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer.* 2000;87(6):787-793.
 26. Chanut A, Duguet F, Marfak A, et al. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia.* 2014;28(4):871-879.
 27. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995;14(12):2876-2883.
 28. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, et al. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF- κ B pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med.* 2008; 205(6):1317-1329.
 29. Le Clorennec C, Ouk T-S, Youlyouze-Marfak I, et al. 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.* 2008;82(13):6721-6733.
 30. Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hölzel M, et al. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(2):397-406.
 31. Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, et al. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(16):e137.
 32. Mbalaviele G, Sommers CD, Bonar SL, et al. A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329(1):1-25.
 33. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011; 470(7332):115-119.
 34. Morse HC, Anver MR, Fredrickson TN, et al. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood.* 2002; 100(1):246-258.
 35. Kato H, Karube K, Yamamoto K, et al. Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci.* 2014;105(5):537-544.
 36. Ding BB, Yu JJ, Yu RY-L, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2008;111(3):1515-1523.
 37. Morton LM, Kim CJ, Weiss LM, et al. Molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected patients in the pre-highly active antiretroviral therapy and pre-rituximab era. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(3):551-557.
 38. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood.* 2016;127(22):2732-2741.
 39. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature.* 2009;459(7247):712-716.
 40. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2009;459(7247):717-721.
 41. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012; 367(9):826-833.
 42. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia.* 2013;27(1):183-189.
 43. Moore CR, Liu Y, Shao C, Covey LR, Morse HC, Xie P. Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice. *Leukemia.* 2012;26(5):1122-1127.
 44. Li Z, Wang H, Xue L, et al. Emu-BCL10 mice exhibit constitutive activation of both canonical and noncanonical NF- κ B pathways generating marginal zone (MZ) B-cell expansion as a precursor to splenic MZ lymphoma. *Blood.* 2009;114(19):4158-4168.
 45. Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, et al. Constitutive canonical NF- κ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2010;18(6):580-589.
 46. Zhang B, Calado DP, Wang Z, et al. An oncogenic role for alternative NF- κ B signaling in DLBCL revealed upon deregulated BCL6 expression. *Cell Rep.* 2015;11(5):715-726.
 47. Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science.* 1997;276(5312):596-599.
 48. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000;13(2):199-212.
 49. Ci W, Polo JM, Cerchiotti L, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood.* 2009; 113(22):5536-5548.
 50. Fowler NH, Cheah CY, Gascoyne RD, et al. Role of the tumor microenvironment in mature B-cell lymphoid malignancies. *Haematologica.* 2016;101(5):531-540.

c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- κ B activated B cells

Amandine David,^{1,2*} Nicolas Arnaud,^{1,2*} Magali Fradet,^{1,2} H el ene Lascaux,^{1,2} Catherine Ouk-Martin,^{1,2,3} Nathalie Gachard,^{1,2} Ursula Zimmer-Strobl,⁴ Jean Feuillard,^{1,2} and Nathalie Faumont^{1,2}

¹CNRS-UMR 7276, University of Limoges, France; ²Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, France; ³Platform of Cytometry and Imagery (CIM), University of Limoges, France and ⁴Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany

**AD and NA contributed equally to this work.*

 2017 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2016.156281

Received: September 8, 2016.

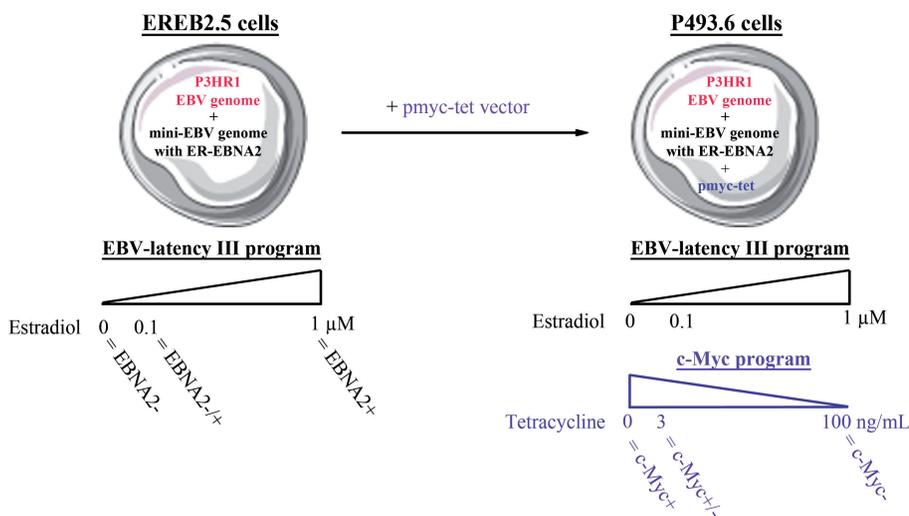
Accepted: February 21, 2017.

Pre-published: February 23, 2017.

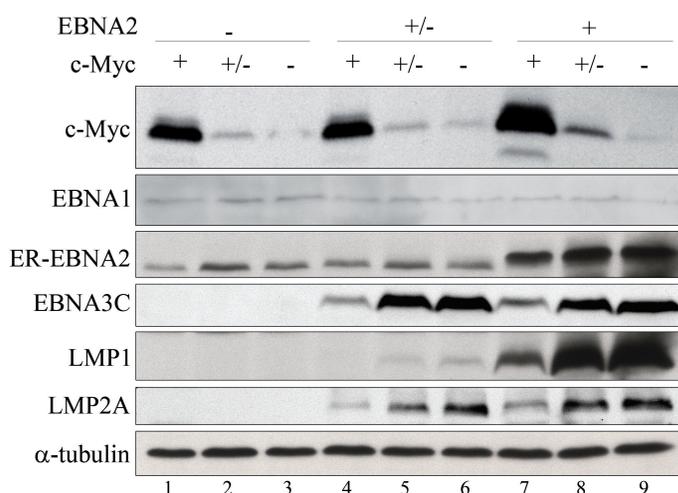
Correspondence: nathalie.faumont@unilim.fr

Figure S1

a



b



c

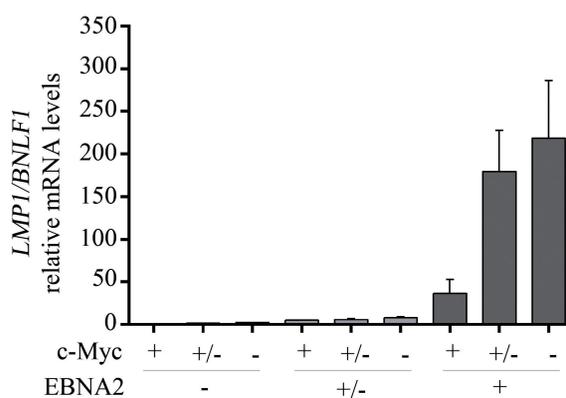
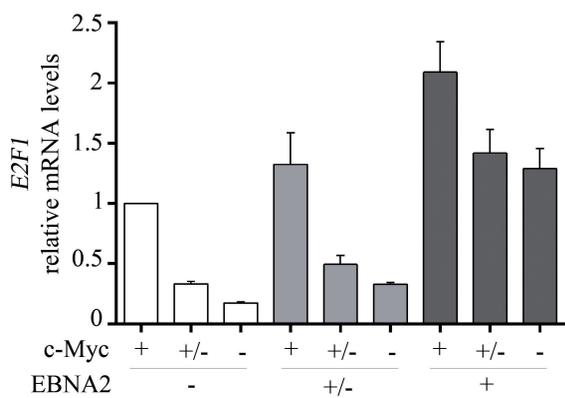
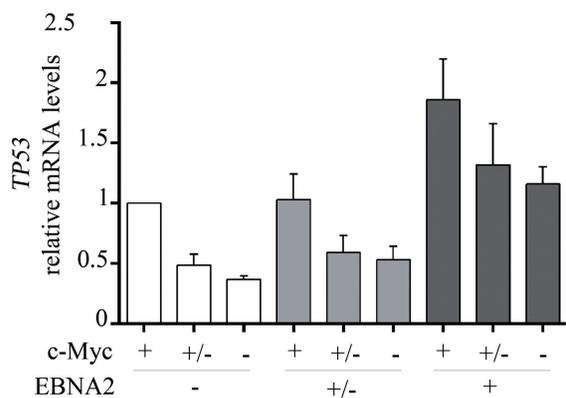
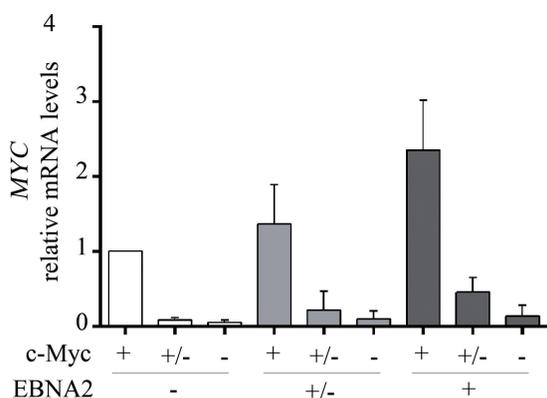


Figure S1. C-Myc and EBV proteins expression in the P493.6 cell model. (a) Scheme showing P493.6 cells derived from EREB2.5 cell line. The EBV-latency III program (*i.e.* LMP1, LMP2a, EBNA1, EBNA2, EBNA3A/B/C) is induced by estradiol addition, and c-Myc is down-regulated by tetracycline addition in a dose dependent manner. (b) P493.6 cells were treated or not with two doses of estradiol (0=EBNA2-, 0.1=EBNA2+/- and 1 μ M=EBNA2+) and/or with tetracycline (0= c-Myc+, 3 μ g/mL=c-Myc+/- and 100 μ g/mL=c-Myc-) for 48 hours. Expression of c-Myc, EBNA1, ER-EBNA2, EBNA3C, LMP1 and LMP2a was assessed by Western-blot. Detection of α -tubulin was used as a loading control. One representative of 3 independent experiments is shown. (c) For each cell condition, mRNA expression of *MYC*, *TP53*, *E2F1*, and *LMP1/BNLF1* genes was quantified using TaqMan® Gene Expression Assays. Relative mRNA fold changes were calculated as the ratio of control cells to P493.6 cells without estradiol or tetracycline (*i.e.* cells under c-Myc alone). Data are shown as mean \pm standard deviation (n=2-3 independent experiments).

Comment:

P493.6 cell line, in which c-Myc over-expression is negatively regulated by addition of tetracycline (*Tet-off* system), is derived from EREB2-5 cells co-infected by the EBNA2-deficient P3HR1 EBV strain and a mini-EBV vector harboring the open reading frame sequence coding for the estradiol regulatable Estrogen Receptor-EBNA2 fusion protein (ER-EBNA2)¹⁻³ (Figure S1a). Without estrogen or tetracycline, P493.6 cells mimicked EBV features of Burkitt's Lymphoma with an EBV-latency I pattern of viral proteins², *i.e.* EBNA1 expression and absence of EBNA3C, LMP1 and LMP2A expression (Figure S1b, lane 1). Residual expression of inactive ER-EBNA2 corresponded to Wp promoter activity. After tetracycline addition, c-Myc expression was turned-off at both protein (Figure S1b, lanes 2 and 3), and mRNA levels (Figure S1c). Expression of *TP53* and *E2F1* genes, both well-

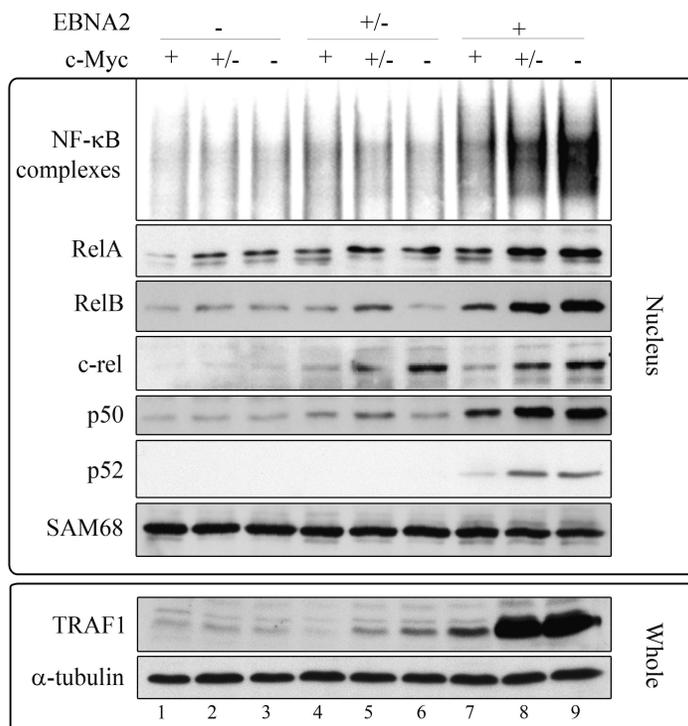
known c-Myc target genes, was also inhibited by c-Myc repression (Figure S1c). The EBV-latency III program was turned on by estradiol addition, as assessed by increased ER-EBNA2 expression and induction of EBNA3C, LMP1 and LMP2A (Figure S1b, lanes 4 and 7). When the EBV-latency III program was induced, c-Myc down-regulation led to a significant increase in EBNA2, EBNA3C, LMP1, and LMP2A expression in a dose-dependent manner (Figure S1b, lanes 5, 6, 8, and 9; and Figure S1c for LMP1 mRNA expression). Highest levels of EBV-latency III proteins were observed when c-Myc over-expression was totally repressed (Figure S1b, lane 9). Repression exerted by c-Myc on EBV-latency III was likely to be due to repression of EBNA2 expression as previously suggested⁴⁻⁶.

Bibliography

1. Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, et al. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol CB*. 1999 Nov 4;9(21):1255–1258.
2. Pajic A, Staeger MS, Dudziak D, et al. Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2001 Sep;93(6):810–816.
3. Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, et al. Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2000 Sep 15;87(6):787–793.
4. Chau CM, Zhang X-Y, McMahon SB, Lieberman PM. Regulation of Epstein-Barr virus latency type by the chromatin boundary factor CTCF. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):5723–5732.
5. Tempera I, Wiedmer A, Dheekollu J, Lieberman PM. CTCF prevents the epigenetic drift of EBV latency promoter Qp. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):e1001048.
6. Hughes DJ, Marendy EM, Dickerson CA, Yetming KD, Sample CE, Sample JT. Contributions of CTCF and DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B to Epstein-Barr virus restricted latency. *J Virol*. 2012 Jan;86(2):1034–1045.

Figure S2

a



b

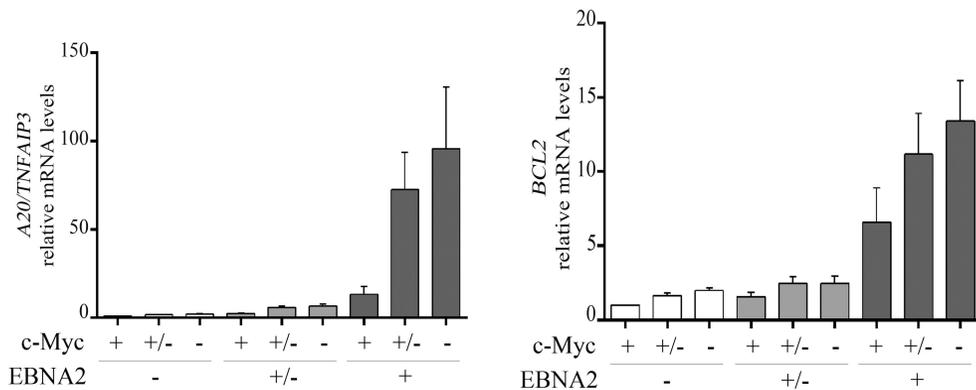


Figure S2. Characterization of NF- κ B in P493.6 cells after induction of EBV-latency III and/or c-Myc. P493.6 cells were treated or not with increasing doses of estradiol (0=EBNA2-, 0.1=EBNA2+/- and 1 μ M=EBNA2+) and/or tetracycline (0= c-Myc+, 3=c-Myc+/- and 100 μ g/mL=c-Myc-) for 48 hours. **(a)** Upper panel: nuclear NF- κ B DNA binding assessed by EMSA. Middle panel: Western-blot detection of nuclear RelA, RelB, c-rel, p50, and p52. Detection of SAM68 was used as a loading control. Lower panel: Western-blot detection of TRAF1 and α -tubulin (loading control) from whole cell extracts. One representative of 3 independent experiments is shown. **(b)** For each cell condition, mRNA expression of *A20/TNFAIP3*, and *BCL2* genes was quantified using TaqMan® Gene Expression Assays. Relative mRNA fold changes were calculated as the ratio of control cells to P493.6 cells without estradiol nor tetracycline (*i.e.* cells under c-Myc alone). Each experiment was performed three times.

Figure S3

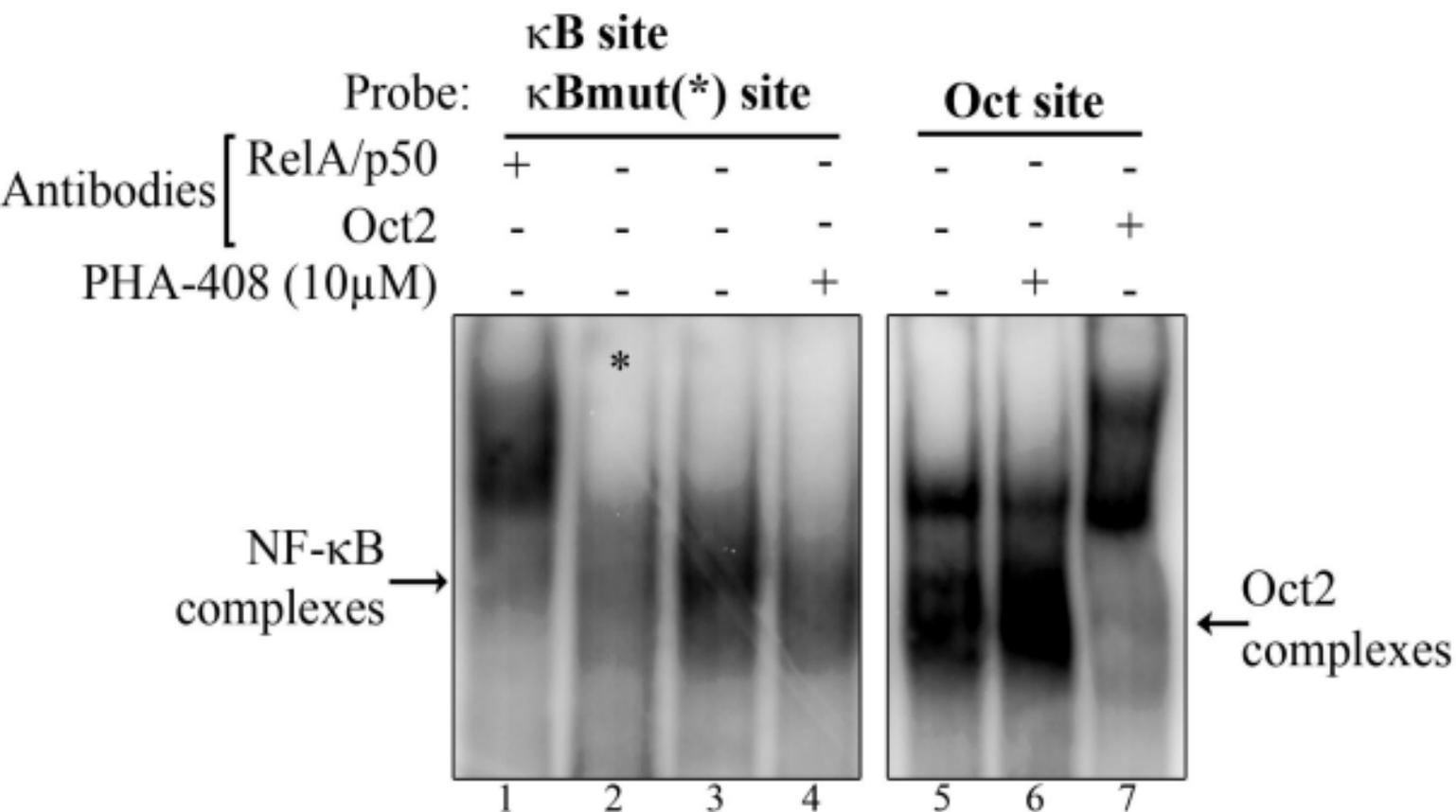


Figure S3. Effect of PHA-408 on NF- κ B and Oct2 DNA binding activities in P493.6 cells after induction of EBV-latency III. P493.6 cells induced for EBV-latency III program (*i.e.* with 1 μ M estradiol plus 100 ng/mL tetracycline) were treated (+) or not (-) with 10 μ M PHA-408 for 48 hours. DNA binding by EMSA was assessed using a probe containing κ B (PRE), κ Bmut(*), or Oct binding sites. Super-shift experiments were done using antibodies against RelA, p50, and Oct2.

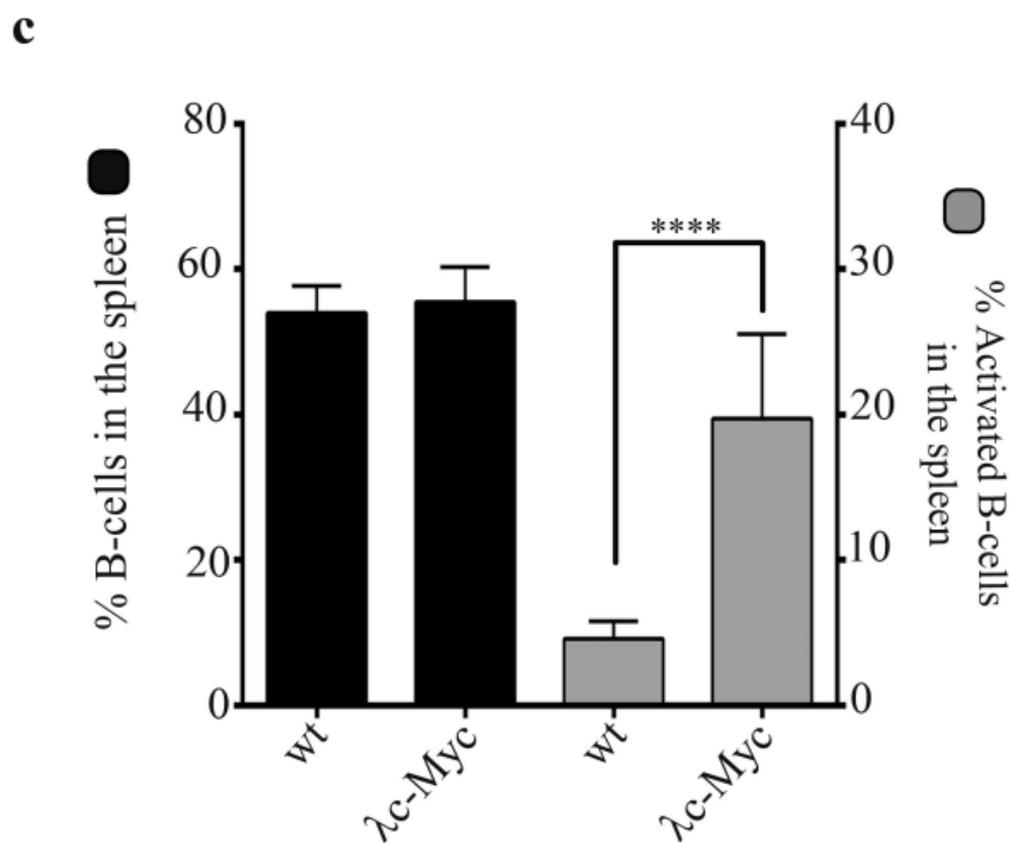
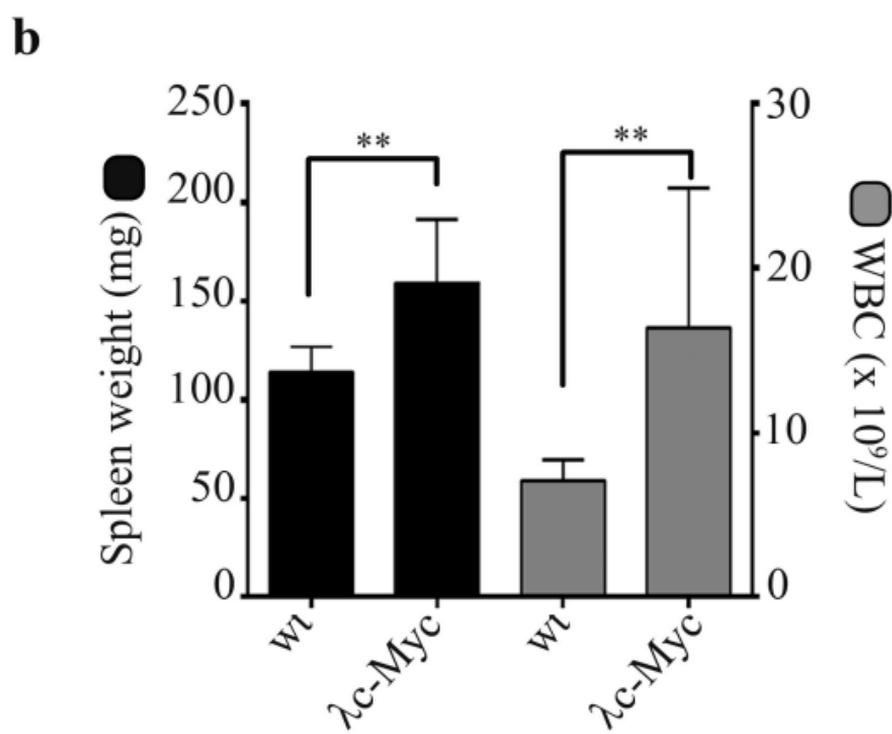
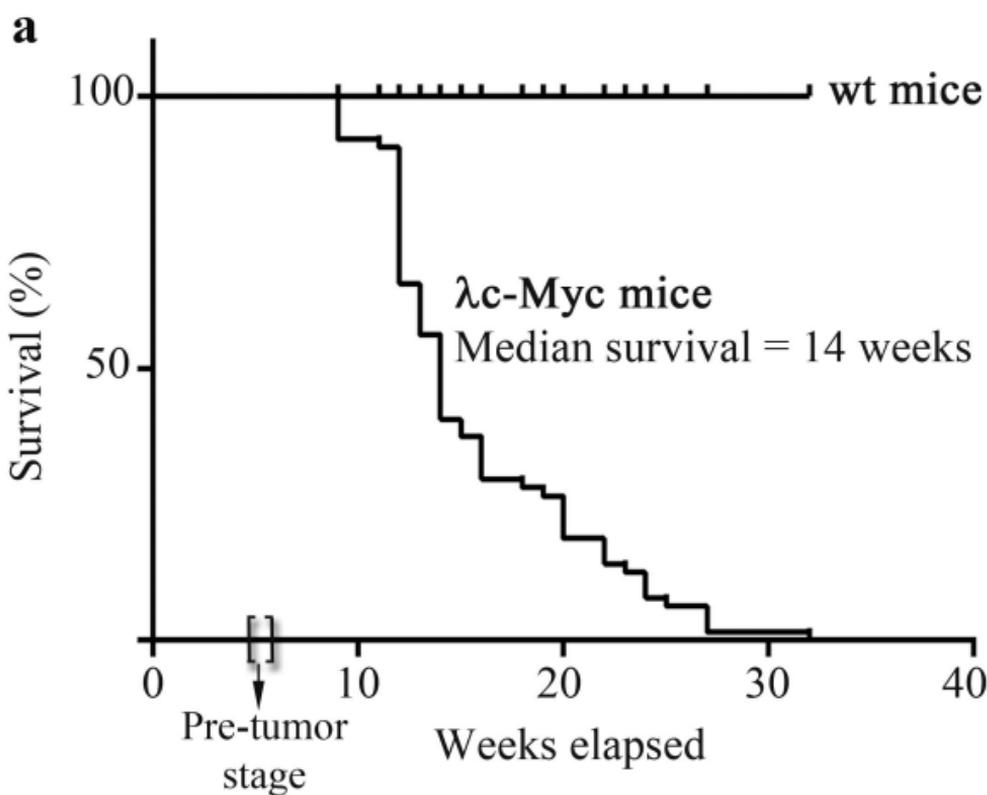
Figure S4

Figure S4. Characterization of pre-tumor λ c-Myc mice. (a) Kaplan-Meier survival plot of wild-type (wt) and λ c-Myc mice. Each group of mice contained 66 subjects. Median survival for λ c-Myc mice is indicated. The pre-tumor stage at 5-6 weeks old is indicated. (b, and c) Transgenic λ c-Myc mice at 5-6 weeks old. (b) Spleen weight (mg; black histograms) and white blood cell counts ($\times 10^9/L$; grey histograms). (c) Percentages of B-cells (B220⁺ cells among TO-PRO³ cells; black histograms) and activated B-cells (CD86⁺ cells among B220⁺ B-cells) in the spleen (grey histograms). Data are shown as mean \pm standard deviation (n=8 mice in each group of experiment). Statistical significance was determined by Student's t test (**, P<0.01; **** P<0.0001).

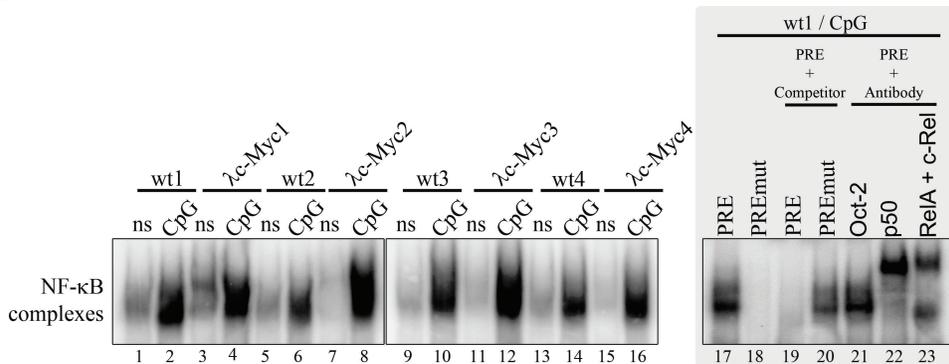
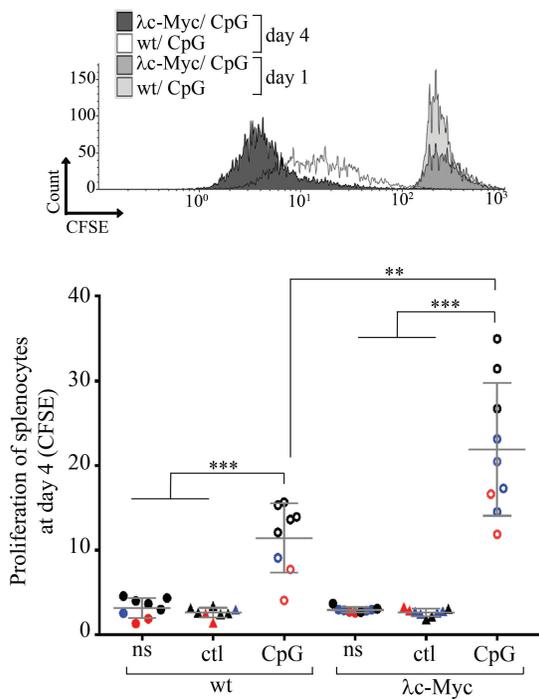
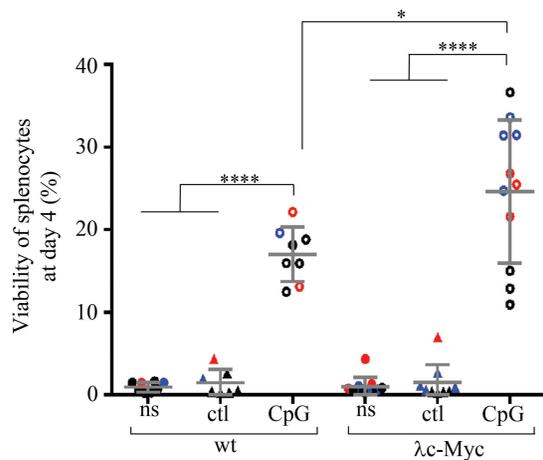
Figure S5**a****b****c**

Figure S5. TLR9 stimulation of splenocytes from pre-tumor λ c-Myc mice. Total splenocytes from 5-6 week old wild type (wt1-4), and λ c-Myc (1-4) mice were stimulated (CpG) or not (ns) with CpG containing oligodeoxynucleotides for 4 days. **(a)** NF- κ B DNA binding activity by EMSA from wt1-4 and pre-tumor λ c-Myc1-4 nuclear extracts. Lanes 1, 5, 9, and 13: unstimulated wt cells. Lanes 2, 6, 10, and 14: wt cells treated with CpG. Lanes 3, 7, 11, and 15: unstimulated λ c-Myc cells. Lanes 4, 8, 12, and 16: λ c-Myc cells treated with CpG. Lanes 17 to 23: NF- κ B DNA binding activity specificity from CpG stimulated wt1 nuclear extracts. Lanes 17 and 18, extracts were incubated with radiolabelled wild type PRE (containing two κ B sites) or PREmut (containing mutated κ B sites) probes respectively. Lanes 19 and 20, competition experiments with PRE probe with a 50-fold molar excess of cold PRE, or PREmut probe, respectively. Lanes 21 to 23, super-shift experiments using anti-Oct2 (irrelevant control), anti-p50, or anti-RelA plus anti-cRel antibodies, respectively. **(b)** Upper panel: CFSE labelling of TLR9 stimulated splenocytes at day 1 and 4. Lower panel: Proliferation rate at day 4 assessed by CFSE labelling of splenocytes. Mice from the same experiment are indicated by the same colour code. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=8-9 mice in each group of experiment). Statistical significance was determined by Student's t test (**, P<0.01; *** P<0.001). **(c)** Splenocytes viability at day 4: percentage of TO-PRO³ negative cells is shown. Mice from the same experiment are indicated by the same colour code. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=8-11 mice in each group of experiment). Statistical significance was determined by Student's t test (*, P<0.05; **** P<0.0001).

Figure S6

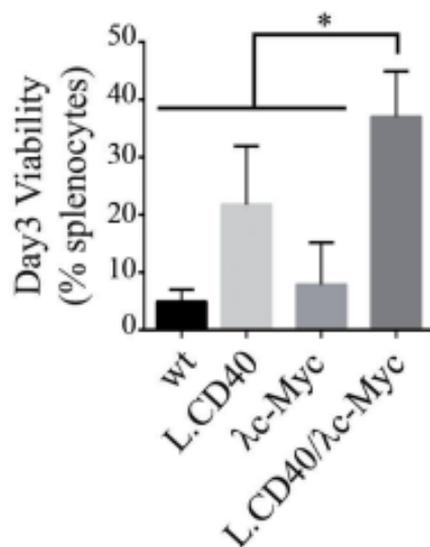
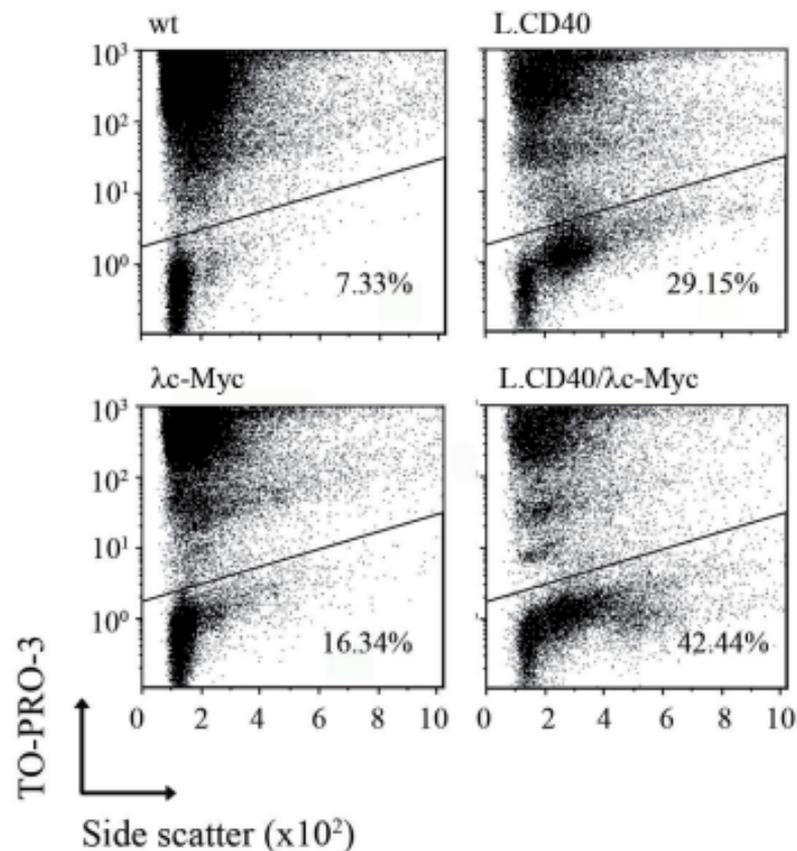


Figure S6. *Ex vivo* viability of splenocytes from L.CD40/ λ c-Myc mice. Splenocytes were isolated from wt, L.CD40, λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc mice. Cells were seeded at 2.5×10^6 /mL in complete medium and spontaneous viability was determined at day 3 using TO-PRO-3 staining. Left panel, representative biparametric TO-PRO-3 versus Side scatter cytograms. Viability percentages were indicated on each cytogram. Right panel, histograms corresponding to viability percentages among splenocytes from wt, L.CD40, λ c-Myc and L.CD40/ λ c-Myc mice. Statistical significance was determined by Student's t test (*, $P < 0.05$).

Table S1. Five clusters of probes corresponding to deregulated genes in P493.6 cells after induction of EBV-latency III and/or c-Myc. We selected 1 648 probes according to their fold change variation of at least two in one of the four cell conditions of P493.6 cells (c-Myc on or off and/or EBV-latency III on or off) when compared to the median of each probe. Probes were grouped into five clusters. For each cluster and cell condition, centered means of gene expressions values with standard error (\pm SE) were calculated. Gene expressions values refer to log₂-values were reported in the table for each sample condition. Each cell condition was repeated once.

Table S2. Thirteen clusters of probes corresponding to deregulated genes in tumor lymph nodes from λ c-Myc/L.CD40 mice. Supervised analysis led to selection of 2 437 significant probes which were partitioned in 13 clusters (Cluster 1 to C13). Gene expression values (log₂-values) centered to the wild type condition, were reported in the table for each clusters. For each sample conditions, fold change value compared to wild type samples were calculated from the mean of centered gene expression values.

Supplementary Methods

Cells, Treatment and Transfection

EREB2.5 cells are a non-classical LCL with an estradiol inducible EBV-latency III proliferation program due to an estrogen receptor fused to the EBNA2 viral protein ¹. The P493.6 cell line is an EREB2.5 derivative transfected with a Tet-off inducible c-Myc expressing vector ². Cell culture conditions have been described elsewhere ³. For transient transfections, P493.6 cells expressing both EBV-latency III and c-Myc programs were transfected with pcDNA3 vector using the Amaxa O.017 program (Amaxa Biosystems, Basel, Switzerland).

Human B-cell lines were TLR9 stimulated with 0.5 μ M ODN-ctl or ODN-CpG (Oligodeoxynucleotides human and mouse CpG-B DNA, prototype ODN 2006 ; Oligodeoxynucleotides non-CpG DNA; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) for 48 hours. NF- κ B inhibition was performed with 5 μ M and 10 μ M PHA-408 [8-(5-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)isonicotinamido)-1-(4-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazole-3-carboxamide] (Axon Medchem, Groningen, The Netherlands) for 48 hours.

Plasmid Constructs

Complementary DNA for I κ B α _{S32,36A} (super-repressor form of I κ B α) was cloned into the pcDNA3.1 vector (Life Technologies, Carlsbad, USA) ⁴.

Western-Blotting

Western-blots were done as previously described ⁵. Antibodies used were anti-EBNA1 (mAb 1H4 ⁶; at 1/100, anti-EBNA2 (mAb PE2; Dako, Les Ulis, France) at 1/200, anti-EBNA3C (mAb E3cA10) ⁷ at 1/500, anti-LMP2A (mAb MD-14-1221; Clinisciences, Nanterre, France) at 1/500, anti-LMP1 (Hybridoma S12) at 1/100, anti-c-Myc (mAb 9E10; Santa Cruz

Biotechnology) at 1/200, anti-p65 (pAb 3034; Cell Signaling Technology) at 1/1000, anti-p100/p52 (pAb 4882; Cell Signaling Technology) at 1/700, anti-p100/p50(NLS) (pAb sc-114; Santa Cruz Biotechnology) at 1/2000, anti-RelB(C-19) (pAb sc-226; Santa Cruz Biotechnology) at 1/2000, anti-c-Rel(N) (pAb sc-70; Santa Cruz Biotechnology) at 1/2000, anti-TRAF1(G-20) (pAb sc-983; Santa Cruz Biotechnology) at 1/1000, anti-I κ B α (FL) (pAb sc-847; Santa Cruz Biotechnology) at 1/200, anti- α -tubulin (mAb B-5-1-2; Santa Cruz Biotechnology) at 1/200. Quantification of western-blots was done using ImageJ software.

Real Time Quantitative Reverse-Transcription PCR

Complementary DNAs were reverse transcribed from total RNA samples using the High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies). PCR products were amplified from 100 ng of each cDNA using the TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Gene Expression Assays were *c-Myc*: Hs00153408_m1; *TP53* gene: Hs00153340_m1; *e2f1*: Hs00153451_m1; *Bcl2*: Hs00153350_m1; and *CD19*: Hs00174333_m1) on an ABI PRISM 7000 automat (Life Technologies). LMP1 mRNAs were quantified using the following probe and primers: primer F-LMP1 5'CATGGACAACGACACAGTGATGA3', primer R-LMP1 5'TTGGAGTTAGAGTCAGATTCATGGC3', and probe 5'(6-Fam) CACCACCACGATGACTCCCTCCCGC3'(Tamra) (Sigma-Proligo, TX, USA). The *CD19* gene was used as a reference gene. The calculated relative gene expression level was equal to 2^{-DDCT} , where DDCT is the delta delta cycle threshold, as previously described⁵. Gene expression fold changes were calculated as the ratio of the test condition to its control.

Gene Expression Profiling

Amplification of RNAs and hybridization onto microarrays were performed on an Affymetrix Gene Atlas system® with: Affymetrix® Human Genome U219 Array Strip, and Affymetrix®

Mouse Gene 2.1 ST Array Strip as previously described⁵. Supervised analysis was performed with the BRB-array tools package, version 4.4, with the “class comparison between group of array” tool (<http://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/> from the NIH institute)⁸. Hierarchical and K-mean clustering were performed as described⁹ with Cluster 3 software (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>)¹⁰. Heat-maps were done with Java Treeview (<http://jtreeview.sourceforge.net/>). Biological functions of genes were studied using “Gene Set Enrichment Analysis” (GSEA) (www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp) and “DAVID Bioinformatics Database” (www.david.ncifcrf.gov/home.jsp).

Preparation of Nuclear Extracts and Electromobility Shift Assays (EMSA)

Methods for nuclear extracts and EMSA are described elsewhere⁵. The nucleotide sequence of the probe with the Oct binding site was chosen according to Klapproth *et al*¹¹: 5'- ACC TGG GTAA TTT GCA TTT CTA AAA T -3'.

Mouse Models

λ c-Myc mice on a C57BL/6 background¹² were kindly provided by Pr. Georg Bornkamm (Helmholtz Center, Munich, Germany). The conditional transgenic mouse model overexpressing LMP1.CD40 fusion transgene in B lymphocytes on a BALB/c background has been described elsewhere¹³. All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number: 87-022 and French ethics committee registration number “CREEAL”: 09-07-2012).

Cell Labeling and Proliferation

After lysis of red-blood cells using RBC Lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA), total mouse splenocytes were immunostained and proliferation was assessed using CFSE

(Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester; Life Technologies) staining and EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine; Life Technologies) incorporation.

To assess *in vitro* proliferation of cultured B-cells, BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) incorporation was performed as previously described ⁹. Briefly, cells were incubated in 18 µg/mL BrdU over 2 and 4 hours for P493.6 cell line and primary B-cells respectively.

Ki-67 labelling was also used to follow proliferation using imaging flow cytometry with the ImageStream 100 apparatus (Amnis*; Merck, Darmstadt, Germany).

In details, After lysis of red-blood cells using RBC Lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA), total splenocytes were immunostained with anti-B220-FITC (mAb RA3-6B2; Biolegend, San Diego, USA) at 1/200, anti-B220-PerCP (mAb RA3-6B2; Biolegend) at 1/50, anti-CD80-APC (16-10A1; Biolegend) at 1/1200, and anti-CD86-FITC (mAb GL-1; Biolegend) at 1/300. Cell viability was estimated with 2 µM TO-PRO®-3 (Life Technologies). To analyze B-cell sub-populations, splenocytes were immunostained with anti-B220-BV510 (mAb RA3-6B2; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at 1/100, anti-CD19-APC-H7 (1D3; BD Biosciences) at 1/100, anti-CD21-BV605 (7G6; BD Biosciences) at 1/100, and anti-CD23- APC-Cy7 (EBVCS-5; Biolegend) at 1/100.

To assess *ex vivo* proliferation of splenocytes, cells were labeled with CellTrace CFSE (Life Technologies), seeded on 96-well plates at 2.5×10^6 /mL, and stimulated with: 2 µg/mL ODN-Control (ODN 1826 control; InvivoGen, Toulouse, France), and 2 µg/mL ODN-CpG (ODN 1826, InvivoGen). At days 1 and 4, 2 µM TO-PRO®-3 was added, and CFSE mean fluorescent intensity (MFI) was determined on living cells. Proliferation rate at day 4 was

calculated: ratio of MFI at day 1 to MFI at day 4. Proliferation was also evaluated by 50 μ M EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) incorporation for 14 hours. Then, cells were stained with anti-B220-FITC (mAb RA3-6B2; Biologend) and EdU was detected using reagents in the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging Kit (Life Technologies).

Cell counts were performed with the CELL-DYN Emerald cell counter (Abbott, Rungis, France). Flow cytometry data were acquired on a FACS Calibur cytometer (BD Biosciences) or LSR-FORTESSA (BD Biosciences) and analyzed with the Kaluza® Flow Analysis software (Beckman Coulter, Roissy, France).

Follicular (FO, CD23-high, CD21-low), marginal zone (MZ, CD23-low, CD21-high), and CD21/CD23 negatives B-cells were sorted after immunostaining with anti-B220-APC (mAb RA3-6B2; Biologend) at 1/100, anti-CD21-FITC (7G6; BD Biosciences) at 1/100, and anti-CD23-PerCP (EBVCS-5; Biologend) at 1/100, using the FACS-ARIA.III cell sorter (BD Biosciences). Then, B-cells were seeded at 5×10^5 /mL, and stimulated with: 2 μ g/mL ODN-Control and ODN-CpG. At day 4, cells were counted using Trypan-blue exclusion and cytopspins were performed after BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine; Sigma-Aldrich) incorporation at 18 μ g/mL for 4 hours. BrdU positive cells were immunostained using BrdU *In-Situ* Detection Kit (BD Biosciences).

In vivo TLR9 stimulation was done through 10 intraperitoneal injections with 50 μ g ODN-CpG or control (ODN-ctl) (ODN 1826, InvivoGen). To follow *in vivo* B-cell proliferation, mice were intraperitoneally injected with 2 mg BrdU about 24 hours before their sacrifice. BrdU positives B-cells were immunostained using anti-BrdU-FITC (3D4; BD Pharmingen) and 1/100 anti-B220-BV421 (mAb RA3-6B2; Biologend) antibodies.

Imaging Flow Cytometry for Ki67 Labeling (Amnis)

Cells were fixed and permeabilized using the PerFix-nc Kit (Beckman Coulter). Labeling was performed with anti-Human Ki-67 at 1/100 (mAb MIB-1, Dako), and the antibody Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) at 1/200 (Life Technologies) was used as secondary antibody. Isotypic control was Negative Control Mouse IgG1 (X0931, Dako). Then, DRAQ5® (Cell Signaling) was added at 1/1000, and cells were analyzed with ImageStream 100 apparatus (Amnis*; Merck).

IDEAS® image analysis software (Amnis*) was used to quantify nuclear events by automatically correlating the images of Ki-67 labeling and the nucleus (DRAQ5®), using the Similarity score (pixel-by-pixel correlation of the Ki-67 and DRAQ5® image pair within the nuclear morphology mask). Among cells with nuclear Ki-67 staining, percentage of cells with high Ki-67 levels was defined.

Apoptosis was assessed from Ki-67 and DRAQ5® non-colocalized cells. Nuclear morphometric parameters were then used to define the percentage of apoptotic cells using analysis software.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded murine samples were sliced at 5 mm. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and antibodies against Ki-67 (LifeSpan BioSciences). Revelation was performed with Zytochem-Plus HRP kit (Zymoted Systems).

Bibliography

1. Kempkes B, Zimmer-Strobl U, Eissner G, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-

- Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol*. 1996 Feb;77 (Pt 2):227–237.
2. Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, et al. Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2000 Sep 15;87(6):787–793.
 3. Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Jul 1;189(1):181–190.
 4. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*. 1995 Jun 15;14(12):2876–2883.
 5. Chanut A, Duguet F, Marfak A, et al. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia*. 2014 Apr;28(4):871–879.
 6. Grasser FA, Murray PG, Kremmer E, et al. Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood*. 1994 Dec 1;84(11):3792–3798.
 7. Maunders MJ, Petti L, Rowe M. Precipitation of the Epstein-Barr virus protein EBNA 2 by an EBNA 3c-specific monoclonal antibody. *J Gen Virol*. 1994 Apr;75 (Pt 4):769–778.
 8. Zhao Y, Simon R. BRB-ArrayTools Data Archive for human cancer gene expression: a unique and efficient data sharing resource. *Cancer Inform*. 2008;6:9–15.
 9. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, et al. c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol*. 2009 May;83(10):5014–5027.
 10. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Dec 8;95(25):14863–14868.

11. Klapproth K, Sander S, Marinkovic D, Baumann B, Wirth T. The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2448–2458.
12. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, et al. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med*. 2000 Oct 16;192(8):1183–1190.
13. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, et al. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF- κ B pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2008 Jun 9;205(6):1317–1329.

II.2. Evaluation de l'impact au stade pré-tumoral, d'une activation du TLR9 (ODN CpG) sur l'activation des cellules B et la composition du microenvironnement dans le modèle murin λ c-Myc.

II.2.1. Introduction.

Suite aux résultats obtenus montrant que l'activation du TLR9 dans le modèle murin λ c-Myc au stade pré-tumoral (4 à 5 semaines) conduisait à une splénomégalie, une lymphadénopathie et une augmentation de la prolifération *in vivo* et *ex vivo* des cellules B (Arnaud et al., 2017), nous avons souhaité préciser l'effet de cette stimulation TLR9 sur les cellules du microenvironnement tumoral. L'activation des TLR permet la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative (Delneste et al., 2007; Matzinger, 2002). Le TLR9 a une localisation endosomale et reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN double brin de virus ou de bactéries par exemple. Ce récepteur est exprimé par différentes cellules de l'immunité comme les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules NK, les macrophages ou encore les cellules dendritiques (Henault et al., 2005). Lors de l'activation du TLR9, le récepteur fixe la protéine MYD88 et l'activation de la voie classique de NF- κ B s'en suit (*cf* I.2.3.1). L'activation du TLR9 dans les cellules du microenvironnement tumoral peut avoir un effet délétère sur la cellule B tumorale, par augmentation de l'immunogénicité des cellules tumorales ou par accroissement de la surveillance immune (Weiner, 2009). La signalisation induite par le TLR9 joue un rôle important dans l'initiation de la réponse immune adaptative en réponse aux infections. L'activation des cellules dendritiques par le TLR9 permet l'activation des lymphocytes Th1 et T cytotoxiques CD8⁺, ainsi que l'activité cytotoxique des cellules NK qui produisent alors de l'IFN- γ . La stimulation du TLR9 permet aussi la prolifération et la survie des lymphocytes B normaux, et également des lymphocytes B tumoraux surexprimant c-Myc comme nous le montrons dans l'article présenté ci-avant. La stimulation par le TLR9 peut donc être pro-tumorigène en stimulant la cellule B tumorale ou anti-tumorigène en stimulant le microenvironnement immun. En même temps, il est clairement admis que le microenvironnement immun de la tumeur peut aussi avoir des effets en faveur de la cellule tumorale comme démontré dans de nombreux cancer (Jensen et al., 2012; Nissinen et al., 2016; Qian and Pollard, 2010; Soysal et al., 2015; Wu et al., 2012). L'équilibre entre les effets pro- et anti-tumoraux est donc à prendre en compte lors du processus transformant, c'est pourquoi nous avons souhaité caractériser les cellules myéloïdes et



lymphoïdes présentes dans la rate et les ganglions lymphatiques des souris λ c-Myc stimulées ou pas par les ODN-CpG/TLR9.

Dans les ganglions lymphatiques ou la rate, les cellules tumorales coexistent avec des cellules normales. Les cellules de l'immunité présentes dans les tumeurs avec leurs effets pro- ou anti-tumoraux seront décrites en introduction.

II.2.1.1. Les cellules Myéloïdes.

La lignée myéloïde se compose de diverses cellules, les monocytes, qui deviendront les macrophages, les MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*), les polynucléaires, ou encore les cellules dendritiques. Ces cellules font parties du microenvironnement tumoral.

II.2.1.1.1. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM : *Tumor-associated macrophage*).

Les monocytes immatures sont libérés de la moëlle osseuse et, après avoir circulés dans le flux sanguin, migrent dans les tissus pour subir une différenciation terminale en macrophages. Les macrophages jouent un grand nombre de fonctions essentielles pour le remodelage des tissus, l'inflammation et l'immunité. Parmi ces fonctions sont retrouvées la phagocytose, la cytotoxicité et la sécrétion d'une large gamme de facteurs tels que des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases, des composants du complément, des facteurs de coagulation, de prostaglandines et du lysozyme (Bingle et al., 2002). En général, les macrophages sont classés en deux sous-ensembles : M1 et M2 (**Figure 39**) (Mantovani et al., 2002). Le phénotype M1 est caractérisé par la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α . De plus, les macrophages M1 expriment des niveaux élevés de molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et de classe II nécessaires à la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Ainsi, les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse inflammatoire et l'immunité anti-tumorale. Les macrophages M2 peuvent être subdivisés en sous-ensembles appelés M2a, M2b, M2c et M2d. Les cytokines Th2 telles que l'IL-4 et IL-13 peuvent stimuler la conversion des macrophages vers le phénotype M2a, tandis que l'activation des TLR et les complexes immuns induisent les macrophages M2b, et l'IL-10 polarise le sous-type M2c (Sica and Mantovani, 2012). Les macrophages M2a, M2b sont considérés comme des régulateurs de l'immunité en activant les réponses de type Th2. Au contraire, les macrophages M2c sont dits désactivés ou anti-inflammatoires, et ils sont connus pour être impliqués dans la réparation et le remodelage des



tissus (Martinez and Gordon, 2014). À l'intérieur de la tumeur, les macrophages sont une composante majeure du stroma, où ils sont communément appelés TAM (*Tumor-associated macrophage*). Les TAM présentent des fonctions similaires à celles des macrophages M2 et peuvent être caractérisés comme le sous-type M2d (Hao et al., 2012). Les TAM fournissent un microenvironnement favorable à la croissance tumorale, à la survie tumorale et à l'angiogenèse (Pollard, 2004; Qian and Pollard, 2010).

La contribution de l'infiltration des TAM dans le pronostic des DLBCL est extrêmement controversée et leur phénotype est mal caractérisé (Kridel et al., 2015). Dans certaines études, les TAM ont soit un effet négatif sur le traitement de la pathologie ou au contraire un effet positif (Marchesi et al., 2015; Meyer et al., 2011; Nam et al., 2014; Wada et al., 2012). Les TAM ont été associés à l'immunomodulation dans d'autres types de tumeurs (cancers du foie, de la thyroïde ou hépatocellulaire) (Qian and Pollard, 2010). Il existe des preuves cliniques et expérimentales montrant que les macrophages favorisent l'initiation du cancer et de la progression maligne (Pollard, 2004). Au cours de l'initiation de la tumeur, les macrophages M1 créent un environnement inflammatoire qui est mutagène et favorise la croissance. Les macrophages M2 stimulent l'angiogenèse (VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*), améliorent la migration des cellules tumorales et l'invasion (MMP9), et suppriment l'immunité anti-tumorale (Coffelt et al., 2010; Galdiero et al., 2013). Au niveau des sites métastatiques, les macrophages M2 préparent le tissu cible pour l'arrivée de cellules tumorales, puis une les TAM favorise l'extravasation cellulaire de la tumeur, la survie et la croissance (Chanmee et al., 2014; Qian and Pollard, 2010). Leur rôle fonctionnel n'a toutefois pas encore été complètement défini au sein du microenvironnement des lymphomes.



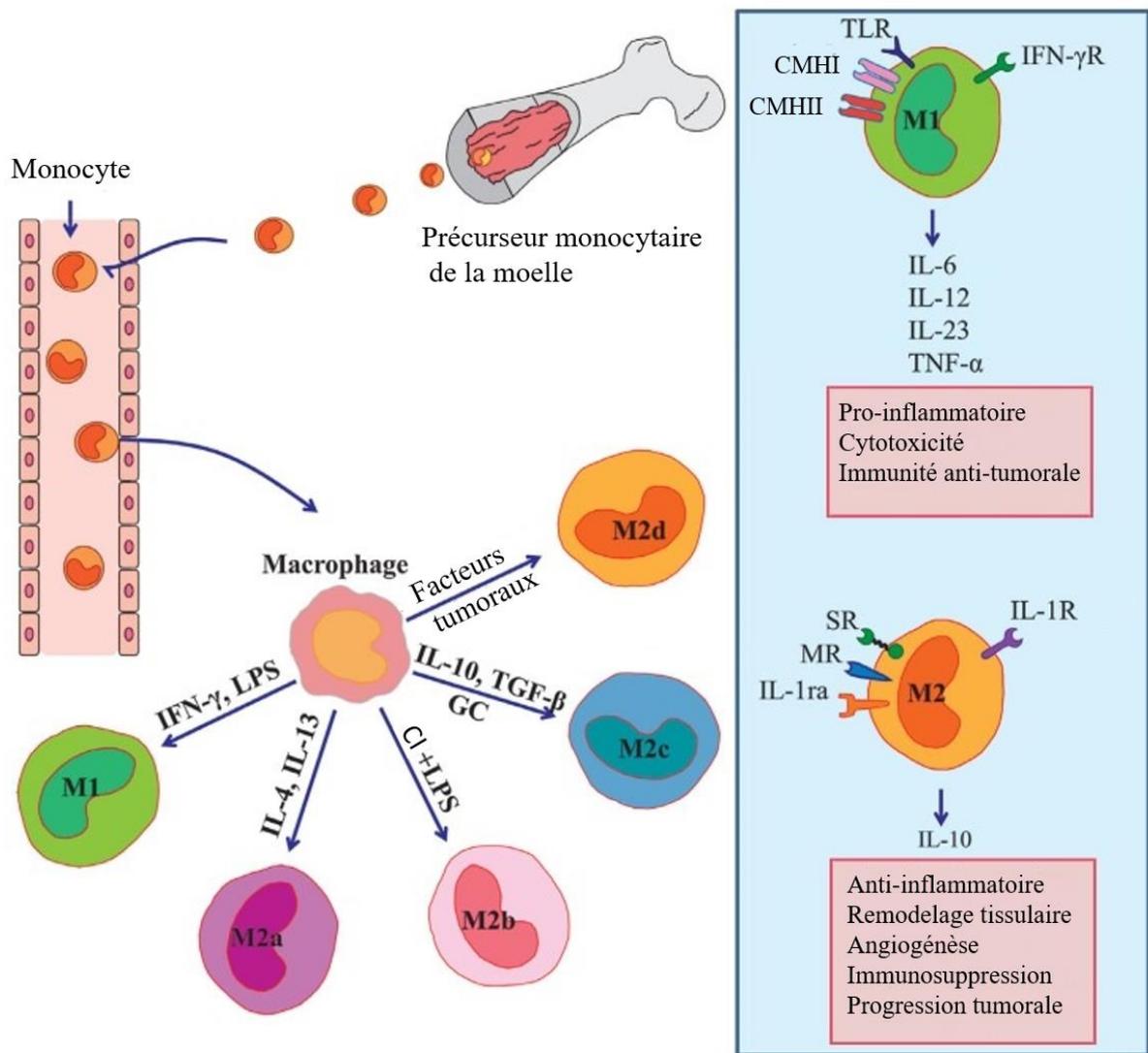


Figure 39 : Polarisation des macrophages et leurs fonctions. Les macrophages tissulaires sont dérivés des monocytes circulants et acquièrent soit un phénotype M1, soit un phénotype M2 en fonction des stimuli du microenvironnement. Le phénotype M1 est dirigé par l'IFN- γ et le LPS, et produit des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α . Le phénotype M2 peut être subdivisé en M2a, M2b, M2c et M2d selon différents stimuli. Les macrophages M2 produisent généralement un niveau élevé d'IL-10, de récepteur « scavenger », de récepteur du mannose, d'antagoniste du récepteur de l'IL-1 et de récepteur à l'IL-1. Le phénotype M1 conduit les réponses pro-inflammatoires, cytotoxiques et anti tumorales. En revanche, le phénotype M2 favorise l'angiogenèse, l'immunosuppression et la progression tumorale (modifié à partir de (Chanmee et al., 2014)).

LPS : lipopolysaccharide; CI : complexe immunitaire; GC : glucocorticoïde; SR : récepteur scavenger; MR : récepteur mannose; IL-1ra : antagoniste du récepteur à l'IL-1; TLR : Toll-like receptor; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité.

II.2.1.1.2. Les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN : Tumor-associated neutrophils).

Les neutrophiles représentent environ 60% de tous les leucocytes dans la circulation et sont habituellement la première ligne de défense sur le site de l'infection ou de

l'inflammation. Contrairement à la capacité bien connue des neutrophiles inflammatoires à phagocyter les bactéries, activer le système immunitaire et induire des lésions tissulaires lors d'infections, il semble que les TAN puissent fonctionner comme des cellules immunosuppressives dans le contexte des tumeurs (Mantovani et al., 2011). Comme les macrophages, les TAN peuvent être divisés en deux catégories : N1 avec un rôle anti-tumoral et N2 pro-tumoral (Fridlender et al., 2009). La polarisation vers le type N2 est en grande partie induite par le TGF- β . Des expériences récentes dans le cancer du poumon murin démontrent que les neutrophiles intra-tumoraux présentent initialement un phénotype anti-tumoral (N1) et que lorsque la tumeur progresse, les TAN se répartissent dans la tumeur et prennent un phénotype pro-tumoral (N2) (Mishalian et al., 2013). Les TAN N1 créent une inflammation en sécrétant des cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-12) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) agissant pour endommager les cellules tumorales (Uribe-Querol and Rosales, 2015). Cependant, ces fonctions sont régulées à la baisse quand la tumeur progresse et le phénotype N2 devient prédominant. Les TAN permettent un remodelage du microenvironnement en favorisant l'angiogenèse (VEGF α , HGF (*hepatocyte growth factor*)) et la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP8, MMP9) (Swierczak et al., 2015), tout ceci participant à l'invasion tumorale et la formation de métastases. Les TAN peuvent également participer à l'immunosuppression, la déplétion des TAN entraîne une augmentation de l'activité des lymphocytes T CD8⁺ (Fridlender et al., 2009). Cette inhibition des lymphocytes T CD8⁺ est due à la libération de l'arginase 1 par les TAN. L'arginase 1 inhibe la prolifération des cellules T en dégradant l'arginine extracellulaire entraînant une diminution de la réponse des cellules T à la stimulation CD3/TCR (Rotondo et al., 2009).

II.2.1.1.3. Les MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*).

Les données sur les MDSC sont limitées dans les maladies humaines. Des marqueurs différents ont été utilisés pour analyser les sous-types de MDSC chez l'homme dans divers milieux cliniques, ce qui complique l'analyse des données. Les MDSC humaines sont CD11b⁺, CD33⁺, HLA-DR^{neg/faible} et peuvent être divisées en populations granulocytaires CD14⁻ et en populations monocytaires CD14⁺ (Talmadge and Gabrilovich, 2013).

Dans le microenvironnement tumoral, les MDSC permettent de supprimer la surveillance immunitaire et maintenir l'auto-tolérance. Les MDSC inhibent la surveillance immunitaire en inhibant l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Gabrilovich et al., 2001, 2012;



Mazzoni et al., 2002), la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques (Gabrilovich et al., 2012), la polarisation des macrophages (Sinha et al., 2005) et la cytotoxicité induite par les cellules NK (Liu et al., 2007). Les MDSC sont présentes dans le sang périphérique des patients atteints de DLBCL avec une survie globale plus faible, suggérant que leur rôle immunosuppresseur favoriserait la pathologie (Azzaoui et al., 2016; Lin et al., 2011). En rapport avec leurs fonctions immunosuppressives, ces MDSC présentent une diminution d'expression du HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen-antigen D Related* : molécule du CMH de classe II) et *ex vivo* après une stimulation CpG, elles n'activent pas la maturation des cellules dendritiques. Dans les DLBCL, les MDSC ont une augmentation de l'expression de PDL-1 et suppriment ainsi la réponse T (Azzaoui et al., 2016).

II.2.1.1.4. Les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques se caractérisent par trois critères : elles sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) exprimant constitutivement des molécules du CMH de classe II, elles sont capables de stimuler les lymphocytes T (LT) naïfs et présentent une morphologie dendritique une fois activées (Steinman, 1991). Les cellules dendritiques permettent de faire le lien entre immunité innée et adaptative. Elles expriment des « *Pattern Recognition Receptors* » (PRRs), c'est-à-dire des récepteurs capables de reconnaître des motifs microbiens appelés « *Pathogen Associated Molecular Patterns* » (PAMPs), parmi ceux-ci on peut noter la famille des TLR. La stimulation de ces TLR par leur ligand induit l'activation des cellules dendritiques. Cette activation va mettre l'expression de médiateurs inflammatoires et de molécules nécessaires à la mise en place d'une réponse immune (Ito et al., 2005). Dans les biopsies de DLBCL, les cellules dendritiques sont principalement localisées autour des vaisseaux lymphatiques ou sanguins (Chang et al., 2007). Les cellules dendritiques peuvent phagocyter les antigènes tumoraux et les présenter aux lymphocytes T. C'est pourquoi les cellules dendritiques sont utilisées pour des protocoles d'immunothérapie anti-tumorale (Palucka and Banchereau, 2013). Les cellules dendritiques sont cultivées *ex vivo* en présence d'antigènes tumoraux et sont réinjectées aux patients pour activer une réponse anti-tumorale dépendante des lymphocytes T.



II.2.1.2. Les cellules lymphocytaires.

II.2.1.2.1. Les lymphocytes T.

Les lymphocytes T (LT) sont des leucocytes mononucléés, issus de la lignée lymphoïde. Ils possèdent un récepteur à l'antigène appelé *T Cell Receptor* (TCR) couplé à un complexe CD3 (transduction du signal). Le TCR permet de reconnaître des peptides (antigènes) présentés par les molécules du CMH. Cette présentation d'antigène permet d'enclencher la réponse immunitaire adaptative. Cette présentation se fait par les CPA lors de la synapse immunologique. Parmi les LT, on peut distinguer deux sous-populations bien définies, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. Les LT CD4⁺ ou LT *helper* jouent un rôle central dans l'orchestration de la réponse immune à travers leur capacité à fournir de l'aide aux autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif (libération de cytokines). Les LT CD8⁺ ou LT cytotoxiques sont les effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire par opposition aux lymphocytes B et aux plasmocytes, effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale (synthèse d'anticorps) (Vallejo et al., 2004).

Dans les DLBCL, la régulation des lymphocytes T et leur fonction sont mal caractérisées à ce jour. Toutefois l'analyse immunohistochimique de biopsies de tissus a mis en évidence une corrélation entre l'infiltration de cellules T et la réponse au traitement. En effet, l'infiltration de LT CD4⁺ a été corrélée à une augmentation de la survie globale chez les patients DLBCL traités avec à la fois la chimiothérapie (CHOP) et le Rituximab (anti-CD20) (Ansell et al., 2001; Keane et al., 2013). La présence de LT CD4⁺ est associée avec une diminution de l'index de prolifération des cellules B tumorales (Ansell et al., 2001). De plus l'expression du CD40 sur les cellules B malignes de DLBCL (77% des cas) semble être associée à une survie globale accrue des patients traités par immuno-chimiothérapie R-CHOP, ce qui pourrait indiquer que l'interaction des cellules de lymphome avec les LT CD4⁺ peut améliorer les réponses par les lymphocytes infiltrant les tumeurs dirigés contre des antigènes tumoraux (Rydström et al., 2010). Dans presque 20% des cas de DLBCL, les LT et les cellules dendritiques ont une distribution péri-tumorale et leur présence est corrélée à la fois *i)* à une augmentation du nombre de lymphocytes infiltrant la tumeur et *ii)* une forte expression du HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*: molécule du CMH de classe II) par les cellules tumorales (Chang et al., 2007). Ces données indiquent que les cellules dendritiques et les



lymphocytes T infiltrant la tumeur sont susceptibles de participer à une réponse immunitaire anti-tumorale coordonnée (Monti et al., 2005).

II.2.1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs.

Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) sont caractérisés par les marqueurs CD4, CD25 et FOXP3. Ils participent à la diminution de l'amplitude des réactions immunitaires et à la prévention de l'auto-immunité par la production notamment d'IL-10 (interleukine 10) et du TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) qui sont toutes deux des cytokines immunosuppressives (Sakaguchi, 2000).

Les LTreg suppriment la présentation de l'antigène par les CPA associées à une tumeur et interfèrent également avec la fonction des LT CD8⁺ en inhibant la libération des granules cytolytiques (Yang et al., 2006). Dans les DLBCL, les LTregs intratumoraux infiltrent les ganglions lymphatiques des patients avec un risque moindre de rechute après un traitement R-CHOP (Coutinho et al., 2015).

II.2.1.2.3. Les lymphocytes B régulateurs (Bregs).

En plus des LTregs, il apparaît que des sous-ensembles de cellules B ayant une fonction immunosuppressive et/ou régulatrice peuvent jouer un rôle critique dans la régulation des réponses immunitaires anti-tumorales humaines (Inoue et al., 2006; Qin et al., 1998). Il existe plusieurs type de cellules B régulatrices (Bregs) (Mauri and Menon, 2015). Les Bregs inhibent les réponses inflammatoires grâce à la production de cytokines immunosuppressives, principalement l'IL-10, le TGF β et l'IL-35 (Fillatreau et al., 2002; Shen et al., 2014; Tian et al., 2001).

II.2.1.2.4. Les cellules Natural Killers.

Les cellules *Natural Killers* (NK) sont des lymphocytes du système immunitaire inné qui peuvent induire la mort des cellules allogéniques et des cellules autologues subissant diverses formes de stress, comme lors de l'infection microbienne et de la transformation maligne (Raulet, 2004). Ils jouent un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale et dans la prévention de la dissémination des métastases. Les NK sont fondamentales dans la défense contre certains virus tel l'EBV. Lors de l'activation, les NK sécrètent des cytokines qui induisent une réponse inflammatoire, modulent l'hématopoïèse, contrôlent les fonctions et la croissance des cellules monocytaires et granulocytaires (Moretta et al., 2002).



Les cellules NK présentent une cytotoxicité directe contre les cellules malignes qui est essentielle pour l'amorçage de la réponse immunitaire adaptative. La lyse des cellules tumorales par les NK libère des antigènes tumoraux, ceux-ci peuvent être pris en charge et présentés aux cellules T. En outre, la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ par les cellules NK recrute des cellules T au niveau du site tumoral, favorisant l'activation des LT et des cellules dendritiques (Smyth et al., 2002).

II.2.1.3. Objectif.

L'objectif est donc d'étudier les différentes populations du microenvironnement immunitaire dans un modèle murin de surexpression de c-Myc (λ -cMyc) (Kovalchuk et al., 2000) avec une stimulation ou non du TLR9.

II.2.2. Matériels et méthodes.

II.2.2.1. Modèles Murins.

Afin d'étudier l'implication du TLR9 dans le processus de cancérisation associée à c-Myc, nous avons travaillé sur le modèle transgénique λ c-Myc où le gène *c-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) (cf I.1.7.2). Ces souris développent des lymphomes de type Burkitt entre 9 et 20 semaines.

II.2.2.2. Stimulation TLR9.

Des souris sauvages et λ c-Myc âgées entre 4 et 5 semaines sont injectées en intrapéritonéal avec 50 μ g d'oligodésoxynucléotides contenant des motifs CpG (ODN-1826 de type B ; Invivogen) ou dépourvus de motifs CpG (ODN-1826 Contrôle) : 10 injections effectuées tous les 2 jours.

II.2.2.3. Isolement des cellules murines et immunomarquages.

Après dissection, la rate et les ganglions lymphatiques sont prélevés, puis broyées sur un tamis de 70 μ 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 β -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. Le nombre de globules blancs extraits des organes 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 ; Miltenyi) avec les anticorps suivants :

Tableau 2 : Liste des différents anticorps utilisés.

Anticorps	clone	Dilution
B220-FITC	RA3-6B2 (Biolegend)	1/200
B220-PE	RA3-6B2 (Biolegend)	1/600
B220-PerCP	RA3-6B2 (Biolegend)	1/50
B220-APC	RA3-6B2 (Biolegend)	1/200
CD19-FITC	6D5 (Biolegend)	1/200
CD19-PerCP	6D5 (Biolegend)	1/50
CD19-APC	6D5 (Biolegend)	1/100
CD80-APC	16-10A1 (Biolegend)	1/1200
CD86-FITC	GL-1 (Biolegend)	1/300
IgM-PE	R6-60.2 (BD bioscience)	1/30
Mac-Bio	M1/70 (Biolegend)	1/250
SA-PerCP	(Biolegend)	1/100
Gr1-PE	RB6-8C5 (Biolegend)	1/1000
CD5-APC	53-7.3 (Biolegend)	1/300
CD49b(DX5)-Alexa488	DX5 (Biolegend)	1/100
CD69-PerCP.Cy5	H1.2F3 (Biolegend)	1/100
CD3-PE	17A2 (Biolegend)	1/100
NK1.1-APC	PK136 (Biolegend)	1/100
CD11c-APC	N418 (Biolegend)	1/100
CMHII-PerCP	M5/114.15.2 (Biolegend)	1/100
PDCA.1-Alexa488	927 (Biolegend)	1/100
CD11c-PerCP	N418 (Biolegend)	1/100
CD3-APC	17A2 (Biolegend)	1/100

II.2.3. Résultats.

Nos expériences ont consisté à stimuler le TLR9 de souris sauvages (WT) et transgéniques λ c-Myc au stade pré-tumoral grâce à l'injection, tous les deux jours pendant deux semaines, d'ODN-Contrôle (ODN-ctl ; absence de motifs CpG) ou d'ODN-CpG. Après sacrifice des animaux, nous avons étudié l'évolution des différentes cellules du système

immunitaire composant la rate et les ganglions lymphatiques. Dans l'ensemble de ces expériences, nous avons distingué :

- Les souris sauvages (4 à 5 semaines) traitées ODN non CpG : wt ODN-ctl (n=7)
- Les souris λ c-Myc (4 à 5 semaines) traitées ODN non CpG : λ c-Myc ODN-ctl (n=7)
- Les souris sauvages (4 à 5 semaines) traitées ODN CpG : wt ODN-CpG (n=6)
- Les souris λ c-Myc (4 à 5 semaines) traitées ODN CpG : λ c-Myc ODN-CpG (n=6)

II.2.3.1. Activation des cellules B après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.

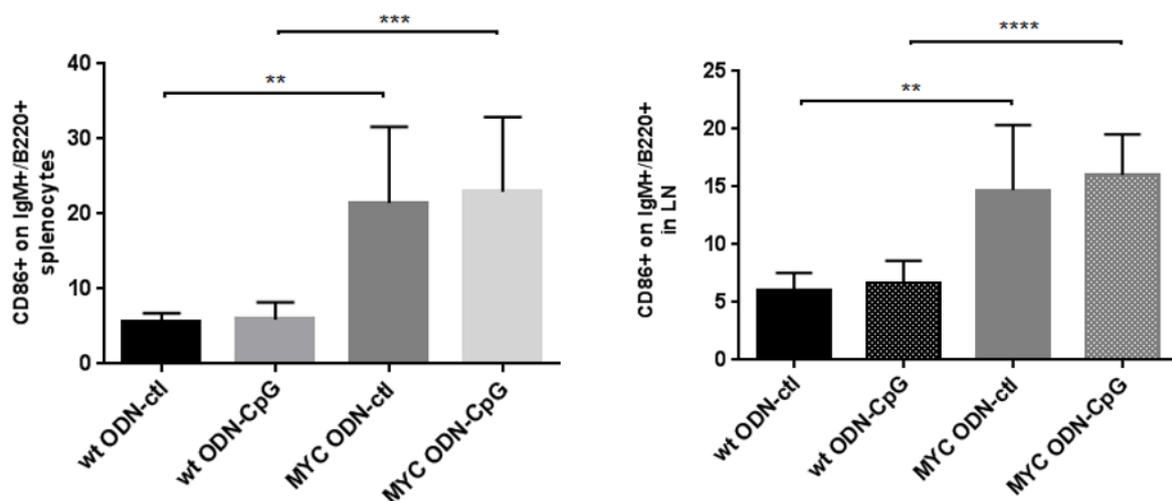


Figure 40 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur l'activation des cellules B in vivo des souris wt et λ c-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux jours. Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules B activées CD86⁺ parmi la population totale de cellules B B220⁺/IgM⁺ in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (n=7 souris dans les conditions ODN-ctl et n=6 dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01).

Par immunomarquage des cellules B B220⁺/IgM⁺/CD86⁺ de la rate et des ganglions, nous avons déterminé le pourcentage de cellules activées CD86⁺ parmi les lymphocytes B. Nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de cellules activées entre les souris traitées ODN-ctl et les souris traitées ODN-CpG (**Figure 40**). Cependant, nous pouvons remarquer que ce pourcentage est augmenté de façon significative entre les souris wt (rate : ODN-ctl : 5,56% et ODN-CpG : 5,92% ; ganglions : ODN-ctl : 6,14% et ODN-CpG : 6,97%) et les souris λ c-Myc quel que soit le traitement (rate : ODN-ctl : 21,49% et ODN-CpG : 22,96% ;

ganglions : ODN-ctl : 15,33% et ODN-CpG : 15,10%). La présence du transgène λ c-Myc, et donc la surexpression de c-Myc dans les cellules B, permet une augmentation de l'activation des cellules B.

Bien que la stimulation du TLR9 augmente la prolifération des lymphocytes B λ c-Myc par rapport aux cellules B normales (Arnaud et al., 2017), l'activation des cellules B reste inchangée.

II.2.3.2. Evolution des populations myéloïdes (polynucléaires, macrophages et cellules dendritiques) après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.

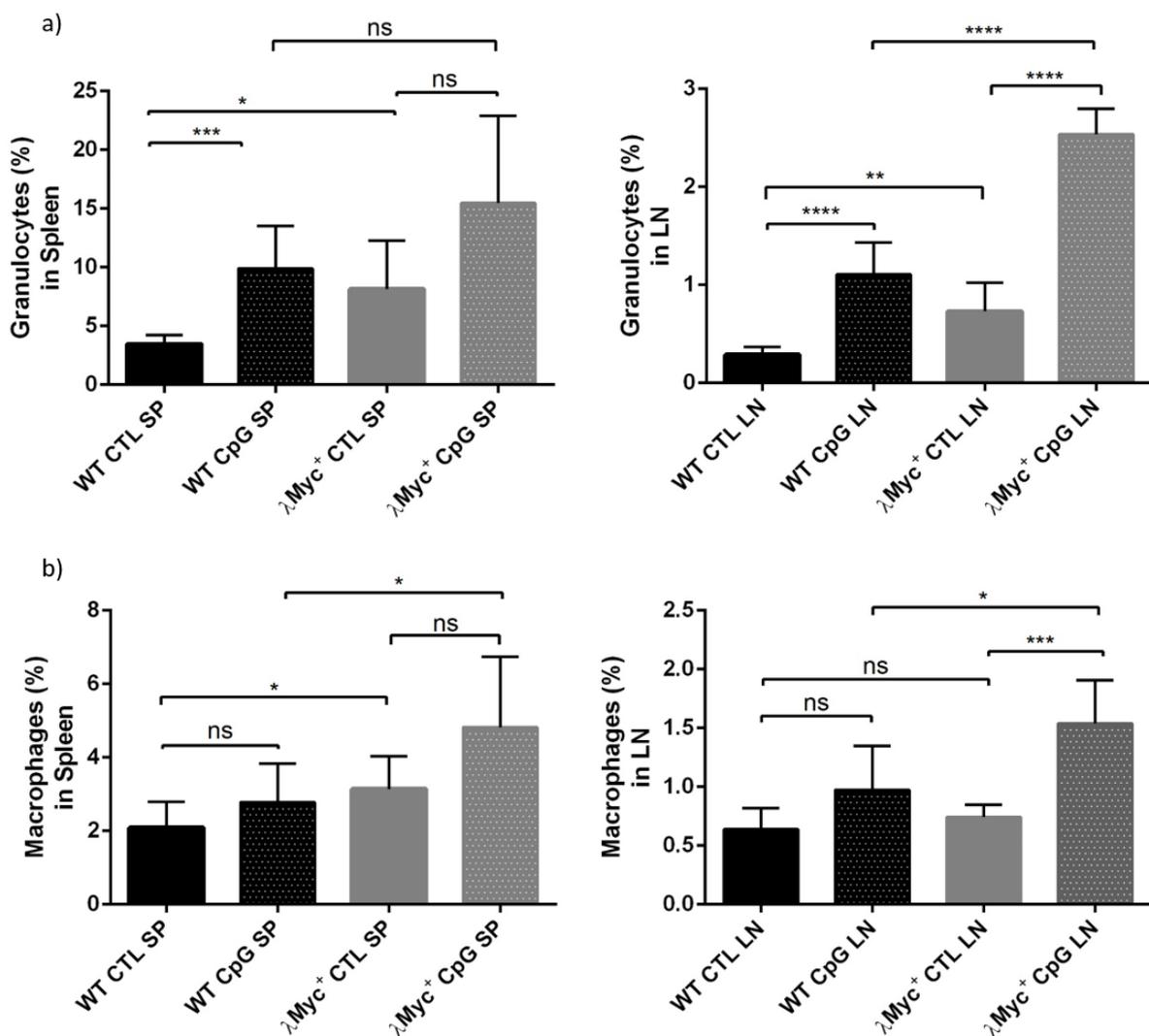


Figure 41 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des polynucléaires et des macrophages in vivo des souris wt et λ c-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux

jours. a) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de polynucléaires B220⁻/CD5⁻/GR1⁺/Mac⁺ parmi la population totale de cellules *in vivo* dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). b) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de macrophages B220⁻/CD5⁻/GR1⁻/Mac⁺ parmi la population totale de cellules *in vivo* dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (n=7 souris dans les conditions ODN-ctl et n=6 dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; *P<0,05 ; ns : non significatif).

Afin d'étudier le pourcentage des polynucléaires, des macrophages et des cellules dendritiques (classique cDC et plasmacytoïdes pDC) au sein de la rate et des ganglions lymphatiques des souris traitées aux ODN, nous avons réalisé des immunomarquages. Les polynucléaires sont B220⁻/CD5⁻/GR1⁺/Mac⁺, les macrophages B220⁻/CD5⁻/GR1⁻/Mac⁺, les cDC B220⁻/CD11c⁺/CMHII⁺ et les pDC B220⁺/CD19⁻/CD3⁻/NK1.1⁻/CD11c⁺/PDCA⁺.

Nous avons ainsi pu observer que le pourcentage de polynucléaires dans la rate et les ganglions était supérieur dans les souris λ c-Myc ODN-ctl par rapport aux souris wt ODN-ctl (8,16% dans les souris λ c-Myc contre 3,46% dans les souris wt dans la rate et 0,73% contre 0,29% dans les ganglions) (**Figure 41a**). Le traitement *in vivo* par les ODN-CpG augmente le pourcentage de polynucléaires dans la rate et les ganglions, que ce soit dans les souris wt (3,46% avec les ODN-ctl contre 9,91% avec les ODN-CpG dans la rate et 0,29% contre 1,11% dans les ganglions) et les souris λ c-Myc (8,16% avec les ODN-ctl contre 15,47% avec les ODN-CpG dans la rate et 0,73% contre 2,54% dans les ganglions). Dans les ganglions lymphatiques des souris λ c-Myc, le pourcentage de polynucléaires est nettement plus important après stimulation du TLR9 par rapport aux souris wt.

En ce qui concerne les macrophages, nous observons une augmentation significative du pourcentage de macrophage dans les splénocytes chez les souris λ c-Myc par rapport aux souris wt (2,09% dans les souris wt ODN-ctl contre 3,14% dans les souris λ c-Myc ODN-ctl) (**Figure 41b**). La stimulation du TLR9 dans les souris wt entraîne une tendance à l'augmentation du pourcentage de macrophages dans la rate et les ganglions (rate : 2,09% contre 2,78% et ganglions : 0,64% contre 0,97%). Nous observons également une augmentation du pourcentage de macrophages dans les souris λ c-Myc après stimulation de TLR9 dans les ganglions (0,74% contre 1,54%). Il est important de noter que les macrophages sont plus abondants dans les souris λ c-Myc par rapport aux souris wt après injection des ODN-CpG (4,82% contre 3,14% dans la rate ; 1,54% contre 0,97% dans les ganglions).



La surexpression de c-Myc dans les cellules B entraîne une augmentation des populations de polynucléaires et macrophagiques dans le microenvironnement des cellules B. La stimulation de TLR9 tend à augmenter les pourcentages de polynucléaires et de macrophages aux seins des différents tissus étudiés (rate et ganglions). Le recrutement et l'activation des polynucléaires et macrophages peuvent se faire de façon indirecte par l'intermédiaire des cytokines sécrétées par les pDC (Krieg, 2006).

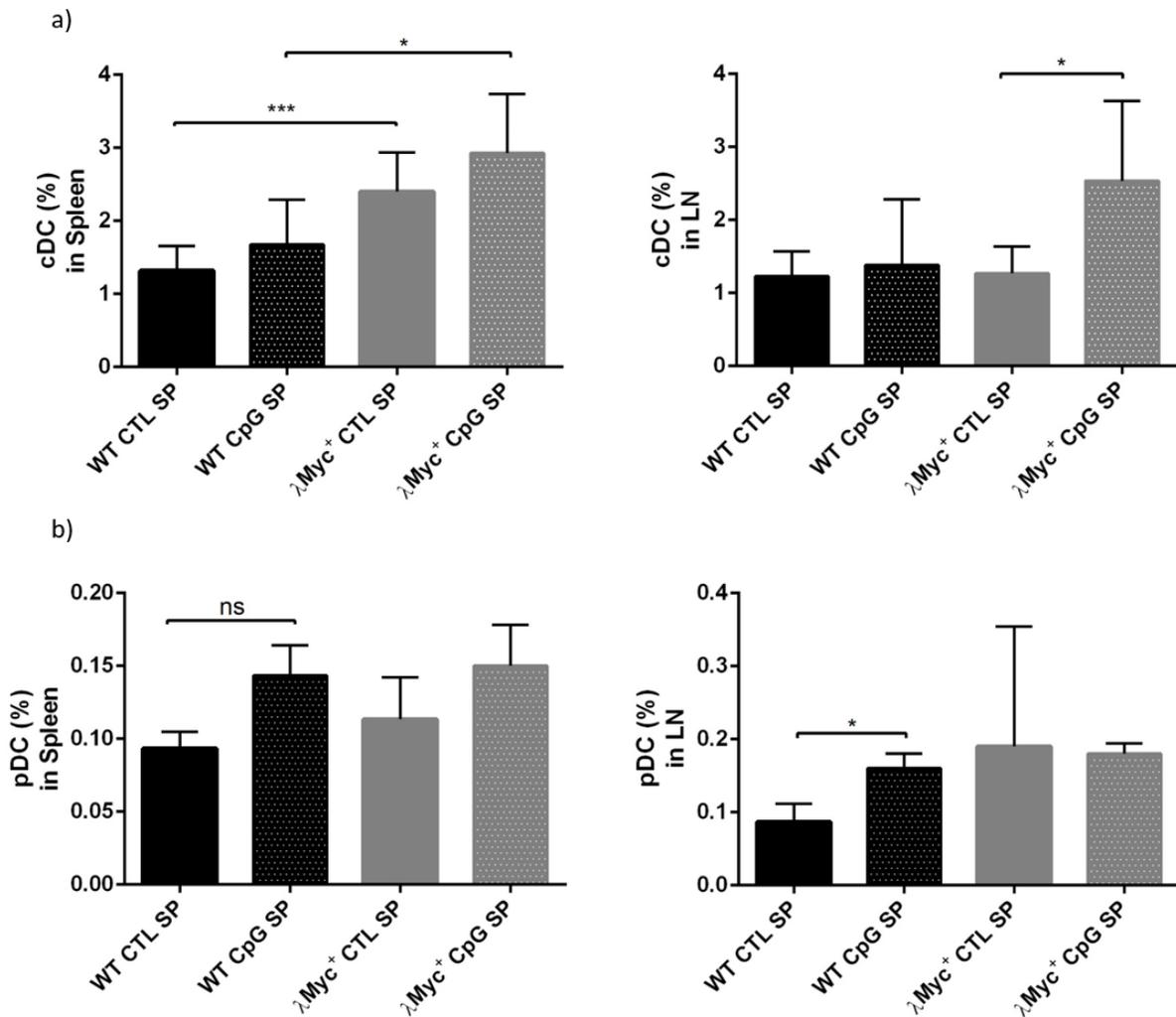


Figure 42 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules dendritiques classiques (cDC) et plasmacitoïdes (pDC) in vivo des souris wt et λc-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux jours. a) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cDC B220⁺/CD11c⁺/CMHII⁺ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). (n=7 souris dans les conditions ODN-ctl et n=6 dans les conditions ODN-CpG) b) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de pDC B220⁺/CD19⁺/CD3⁻/NK1.1⁻/CD11c⁺/PDCA⁺ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions

(gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$ souris dans les conditions ODN-ctl et $n=3$ dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (**** $P<0,0001$; *** $P<0,001$; ** $P<0,01$; * $P<0,05$; ns : non significatif).

Dans la rate, nous pouvons voir que les souris λ c-Myc ont un pourcentage de cDC augmenté par rapport à celui des souris wt (2,40% contre 1,32%) (**Figure 42a**). Bien que la stimulation du TLR9 augmente faiblement la population de cDC, le pourcentage de cDC reste plus important dans les souris λ c-Myc que dans les souris wt après injection des ODN-CpG (dans la rate 2,93% contre 1,68% ; dans les ganglions 2,54% contre 1,38%).

Dans la rate et les ganglions lymphatiques, la stimulation du TLR9 conduit à une très légère augmentation du pourcentage de pDC dans les souris wt (dans la rate 0,09% contre 0,14% ; dans les ganglions 0,09% contre 0,16%) alors qu'aucune différence n'est observée pour les souris λ c-Myc (dans la rate 0,11% contre 0,15% ; dans les ganglions 0,19% contre 0,18%).) (**Figure 42b**). Ces résultats obtenus sur seulement 3 souris devront être confirmés.

Nous avons observé un effet modéré des ODN-CpG sur les populations de pDC et cDC. Comme pour les populations de macrophages et de polynucléaires, la surexpression de c-Myc semble augmenter la population des cDC.

II.2.3.3. Evolution des populations de cellules T ($CD4^+$, $CD8^+$ et T régulateur) et NK après stimulation du TLR9 dans les souris WT et λ c-Myc.

Ensuite nous avons étudié par immunomarquage CD3, CD4 et CD8 d'une part ; et CD4, CD25 et FOXP3 d'autre part, pour identifier les différentes sous populations T. Le premier panel, nous a permis de mesurer les pourcentages de cellules T $B220^-/CD3^+/CD4^+$ et T $B220^-/CD3^+/CD8^+$ et le second les cellules T régulatrices (Treg ; $CD4^+$, $CD25^+$, FOXP3⁺).



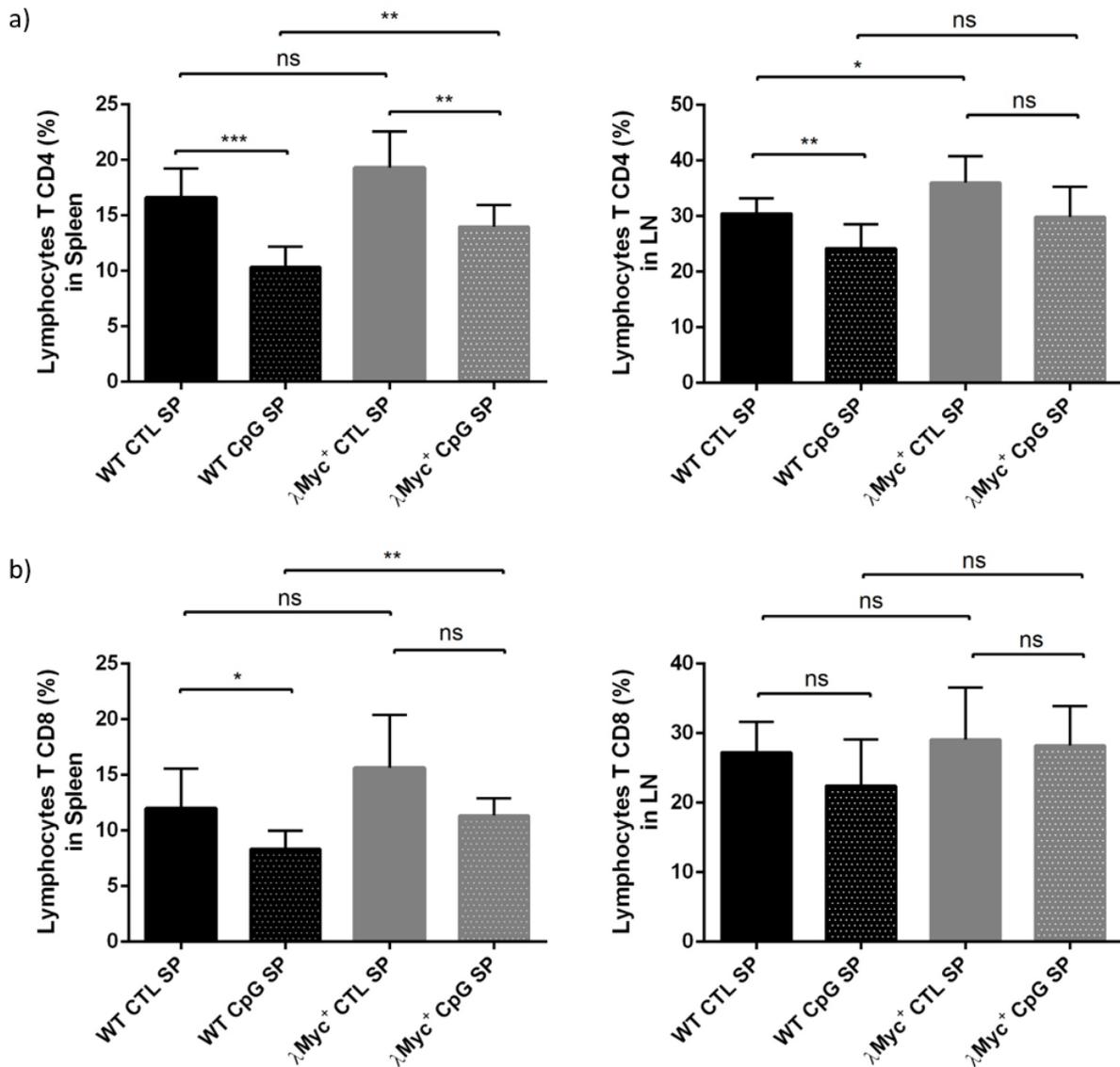


Figure 43 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules T B220⁺/CD3⁺/CD4⁺ et T B220⁺/CD3⁺/CD8⁺ in vivo des souris wt et λc-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux jours. a) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules T B220⁺/CD3⁺/CD4⁺ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). b) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules T B220⁺/CD3⁺/CD8⁺ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n=7 souris dans les conditions ODN-ctl et n=6 dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (***) P<0,001 ; ** P<0,01 ; *P<0,05 ; ns : non significatif).

Dans la rate, le traitement aux ODN-CpG conduit à une diminution du pourcentage de la population de cellules T B220⁺/CD3⁺/CD4⁺ aussi bien dans les souris wt (16,60% contre 10,33%) que dans les souris λc-Myc (19,31% contre 14%) (**Figure 43a**). La surexpression de c-

Myc dans les souris λ c-Myc a tendance à augmenter le pourcentage de cellules $CD4^+$ quel que soit l'ajout ou non d'ODN-CpG. Nous avons observé des résultats similaires dans les ganglions.

En ce qui concerne la population de cellules T $B220^-/CD3^+/CD8^+$, nous observons les mêmes variations, à savoir une diminution du pourcentage lors de la stimulation du TLR9 et une augmentation dans les souris λ c-Myc par rapport au souris wt quel que soit le traitement (**Figure 43b**).

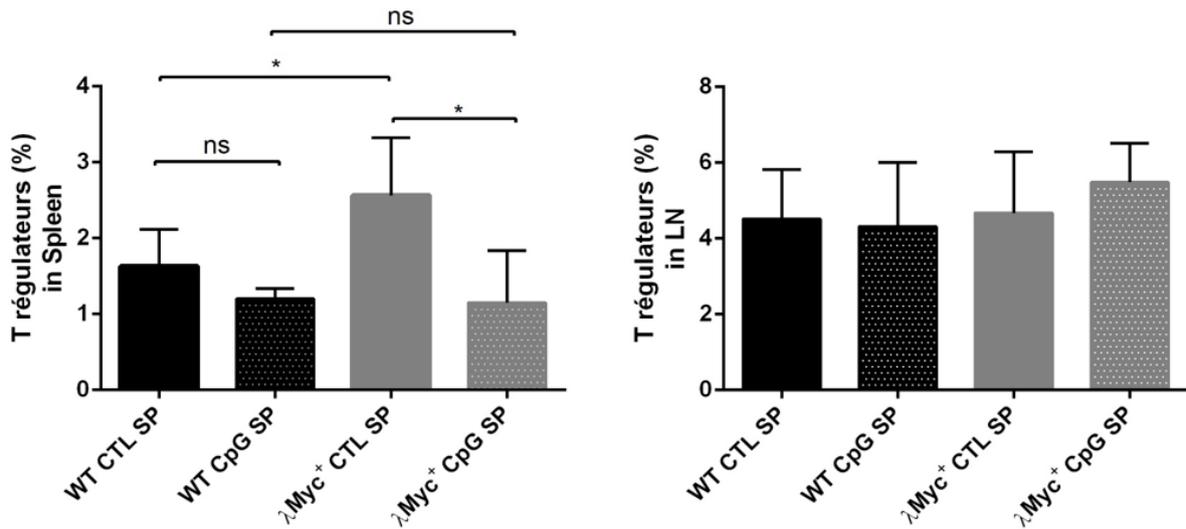


Figure 44 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules T reg $CD4^+$, $CD25^+$, $FOXP3^+$ in vivo des souris wt et λ c-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux jours. Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules T reg $CD4^+$, $CD25^+$, $FOXP3^+$ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=7$ souris dans les conditions ODN-ctl et $n=6$ dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (* $P<0,05$; ns : non significatif).

Après stimulation du TLR9, le pourcentage de Treg ($CD4^+$, $CD25^+$, $FOXP3^+$) a tendance à diminuer dans la rate des souris wt (1,63% contre 1,2%) et est significativement diminué dans les souris λ c-Myc (2,57% contre 1,15%) (**Figure 44**). Nous pouvons noter que le pourcentage de Treg est supérieur dans les souris λ c-Myc ODN-ctl par rapport aux souris wt, et qu'après stimulation du TLR9, ce pourcentage revient au niveau des souris wt. Dans les ganglions, le traitement aux ODN-CpG n'induit pas de modification quant aux pourcentages de cellules Treg.

La surexpression de c-Myc entraîne une augmentation du pourcentage de cellules Treg dans la rate, et cette augmentation est abolie après stimulation du TLR9.

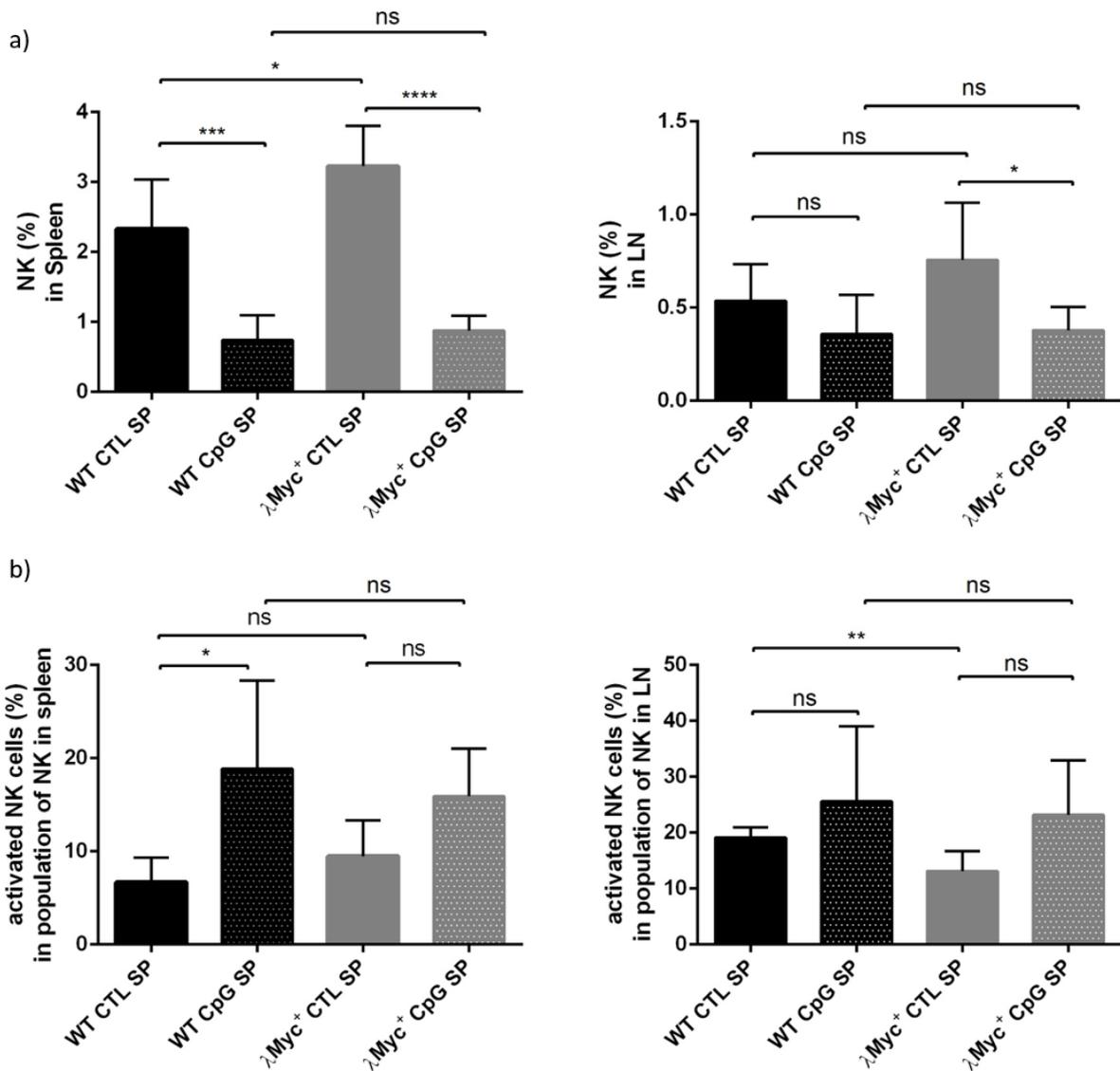


Figure 45 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules NK $CD3^+/CD49b^+/NK1.1^+$ et l'activation des NK $CD3^+/CD49b^+/NK1.1^+/CD69^+$ in vivo des souris wt et λ c-Myc. Stimulation in vivo avec des oligodésoxynucléotides contrôles (ODN-ctl) ou CpG (ODN-CpG): 10 injections intrapéritonéales de 50 mg d'ODN tous les deux jours. a) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules NK $CD3^+/CD49b^+/NK1.1^+$ parmi la population totale de cellules in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). b) Les graphiques représentent la moyenne des pourcentages de cellules NK activées $CD3^+/CD49b^+/NK1.1^+/CD69^+$ parmi la population de cellules NK in vivo dans la rate (droite) et dans les ganglions (gauche). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=7$ souris dans les conditions ODN-ctl et $n=6$ dans les conditions ODN-CpG). La significativité statistique a été déterminée par le test de Student (** $P<0,01$; * $P<0,05$; ns : non significatif).



Pour finir, nous avons déterminé le pourcentage de cellules NK (CD3⁻/CD49b⁺/NK1.1⁺) ainsi que le pourcentage de cellules activées (CD3⁻/CD49b⁺/NK1.1⁺/CD69⁺) parmi la population NK. Dans les souris λ c-Myc ODN-ctl, le pourcentage de cellules NK est augmenté par rapport aux souris wt. Après stimulation du TLR9, le pourcentage de cellules NK est diminué aussi bien dans les souris wt (dans la rate 2,33% contre 0,74%) que les souris λ c-Myc (dans la rate 3,23% contre 0,88%) (**Figure 45a**).

Parmi ces cellules NK, nous pouvons observer une tendance à l'augmentation des pourcentages de cellules NK activées dans la rate et les ganglions après traitement aux ODN-CpG. Cette augmentation est présente dans les souris wt et λ c-Myc (**Figure 45b**).

La stimulation du TLR9 entraîne une diminution du pourcentage de cellules NK, et une augmentation de cellules NK activées. Cette stimulation permet également d'abroger l'augmentation des NK induite par la surexpression de c-Myc.

II.2.3.4. Bilan des résultats.

Le tableau ci-dessous résume les variations du microenvironnement immunitaire dans les souris λ c-Myc par rapport aux souris sauvages en absence ou présence d'ODN-CpG/TLR9.

Tableau 3 : Résumé des différents résultats obtenus. Sont notées uniquement les variations significatives dans la rate et/ou les ganglions lymphatiques. Une flèche ↗ indique une augmentation, une flèche ↘ indique une diminution, et le symbole = indique l'absence de variation significative.

	λ c-Myc/wt ODN-ctl	wt ODN-CpG vs ctl	λ c-Myc ODN-CpG vs ctl	λ c-Myc/wt ODN-CpG
Cellules B activées	↗	=	=	↗
Polynucléaires	↗	↗	↗	↗
Macrophages	↗	=	↗	↗
Cellules dendritiques classiques	↗	=	↗	↗
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	=	↗	=	=

Lymphocytes T CD4 ⁺	↗	↘	↘	↗
Lymphocytes T CD8 ⁺	=	↘	=	↗
Lymphocytes T régulateurs	↗	=	↘	=
NK	↗	↘	↘	=
NK activées	↘	↗	=	=

II.2.4. Discussions, perspectives et conclusions.

La stimulation du TLR9 permet une augmentation de la prolifération des cellules B et une augmentation de leur taille (Krieg, 2000). Dans nos études de stimulation *in vivo* du TLR9 par des ODN-CpG de type B, la prolifération des cellules B, mesurée par incorporation BrdU, est augmentée chez les souris λ c-Myc par rapport aux souris wt (Arnaud et al., 2017). Par contre, la stimulation TLR9 ne modifie pas le pourcentage de cellules activées CD86⁺ dans la population B. La splénomégalie observée lors du traitement CpG des souris λ c-Myc est en grande partie due à l'augmentation du nombre de cellules B. Cependant dans nos analyses de cytométrie en flux, nous remarquons que les cellules B stimulées par les ODN-CpG ont tendance à perdre le marqueur B220 (marqueur des cellules B), nous empêchant ainsi de déterminer avec certitude le pourcentage de cellules B et donc de réellement apprécier l'augmentation de la population lymphocytaire B. Il sera donc nécessaire d'étudier la population B de ces souris en utilisant un autre marqueur des lymphocytes B tel que le CD19.

Tout d'abord, nous avons mis en évidence que la surexpression de c-Myc changeait la composition du microenvironnement immunitaire. En fait, cette surexpression, en plus d'augmenter la prolifération et l'activation des cellules B, induit, dans la rate, une augmentation des polynucléaires, des macrophages, des cellules dendritiques conventionnelles, des cellules T CD4⁺, des lymphocytes T régulateurs et des NK. Il semblerait donc que l'expression de c-Myc dans les cellules B permette le recrutement des cellules du système immunitaire et une augmentation de l'immunosurveillance. Ce recrutement pourrait avoir un effet retardateur sur la lymphomagenèse. Cependant, notons que c-Myc peut aussi



avoir un effet inverse en inhibant l'expression de STAT1, un régulateur clé de la réponse des interférons (Schlee et al., 2007). Le groupe de Rajewsky a développé un modèle murin qui montre que l'oncogène LMP1 de l'EBV est capable d'induire une immunosurveillance très stricte des cellules B, et que l'inhibition des cellules T et NK déclenche l'émergence de lymphomes B très agressifs (Zhang et al., 2012). Il serait donc intéressant d'immunodéprimer les souris λ c-Myc pour suivre d'éventuelle variation dans la cinétique d'apparition des tumeurs.

Ensuite, nous avons observé une augmentation des pourcentages des macrophages et des polynucléaires après stimulation du TLR9 dans les souris λ c-Myc. Cette augmentation pourrait initier une réponse immunitaire contre les cellules pré-tumorales λ c-Myc. Cependant nous avons vu que la présence de macrophages polarisés M1 crée un microenvironnement inflammatoire mutagène pouvant favoriser la croissance tumorale (Qian and Pollard, 2010). De plus, les macrophages polarisés M2 sont pro-tumorigènes, ils favorisent la prolifération, la survie cellulaire, l'invasion tissulaire et inhibe la fonction des cellules T (Galdiero et al., 2013; Qian and Pollard, 2010). Cette immunomodulation pourrait favoriser l'initiation et la progression maligne. La majorité des polynucléaires sont des neutrophiles. Ces neutrophiles sont pro-angiogéniques et immunosuppresseurs (Fridlender et al., 2009), ils augmentent la prolifération des cellules tumorales (Tazzyman et al., 2011) et la production de radicaux libres oxygénés à fort potentiel mutagène (Knaapen et al., 2006). L'augmentation de ces populations dans un contexte pré-tumoral pourrait favoriser la lymphomagenèse en permettant aux cellules de se multiplier, d'accumuler des mutations additionnelles et d'échapper aux systèmes immunitaires. Par la suite, il faudrait définir le phénotype des macrophages et ainsi déterminer leur polarisation (M1 et/ou M2). Le phénotype des neutrophiles devra aussi être déterminé, une autre population de cellules aux propriétés immunosuppressives et présentes dans le microenvironnement mériterait d'être définie, les MDSC.

Le traitement aux ODN-CpG permet la stimulation du système immunitaire. Le TLR9 chez la souris est largement exprimé par les cellules pDC, les cellules B et également par les monocytes/macrophages (Suzuki et al., 2005). En effet, nos analyses montrent qu'après stimulation, nous avons une tendance à l'augmentation des populations de cellules dendritiques. La production d'IFN- α et β par les pDC permet le recrutement et la stimulation d'autres cellules telles que les lymphocytes T, les cellules NK ou encore les monocytes. *In vivo*,



les ODN-CpG de type B induisent une forte sécrétion d'IFN- α (Cheng et al., 2017) par les pDC. L'IFN- α stimule les cellules NK pour qu'ils produisent de l'IFN- γ (Kerkmann et al., 2003). L'IFN- α et γ agissent ensemble pour recruter et stimuler les monocytes, les cDC et les cellules T au site tumoral (Smyth et al., 2002). De plus, les CpG de type B agissent en synergie avec le CD40L pour stimuler la production d'IL-12 par les pDC permettant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers la production de cytokines (Krug et al., 2001). Il serait intéressant de doser les cytokines (IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ) lors de la stimulation du TLR9 et ainsi mettre en évidence une augmentation ou une diminution de celle-ci en fonction du contexte.

Concernant les cellules NK, nous avons une augmentation de l'activation des NK *in vivo* après le traitement aux ODN-CpG. Ce qui semble en accord avec la littérature (Roda et al., 2005). L'activation des NK permet une cytotoxicité directe contre les cellules tumorales et permet la libération d'antigènes tumoraux. Ces antigènes sont alors utilisés par les cellules présentatrices d'antigènes pour activer les cellules T (Smyth et al., 2002). Il est intéressant de noter une diminution du pourcentage de cellules NK après stimulation par les ODN-CpG. Cette observation est également faite sur l'ensemble des populations T. Ce constat est probablement à mettre en relation avec l'augmentation importante du pourcentage de cellules B, de macrophages, et de polynucléaires au détriment du pourcentage de cellules NK et T.

Durant, ces expérimentations, nous avons obtenu une souris λ c-Myc traitée aux ODN-CpG présentant une splénomégalie beaucoup plus importante que les autres. Cette souris présente un pourcentage de cellules B activées nettement supérieur (43,55% dans la rate et 28,74% dans les ganglions lymphatiques) par rapport aux autres souris λ c-Myc ODN-CpG (22,96% dans la rate et 15,10% dans les ganglions lymphatiques). De plus, cette souris présente des pourcentages des différentes populations étudiées drastiquement diminués par rapport aux autres souris. Ce résultat indiquerait qu'une forte expansion des cellules B c-Myc⁺ se fait au détriment des cellules de l'immunité (diminution des pourcentages). L'étude de la cinétique d'évolution des populations immunes au cours de la lymphomagenèse (passage du stade pré-tumoral au stade tumoral) serait intéressante.

Des travaux de l'équipe, ont montré que les cellules B immortalisées par l'EBV/LMP1, qui sont en latence III, surexpriment PDL-1 (ligand de PD1 (*Programmed Cell Death 1*)) (Durand-Panteix et al., 2012) et ont le phénotype caractéristique des cellules B régulatrices



(Breg), à savoir la surexpression de PDL-1, sécrétion de IL-10, IL-35 et TGF- β 1 (Thèse d'Héloïse Auclair ; Travaux non publiés). Dans ces cellules, c-Myc et NF- κ B, les facteurs de transcription maitres de la latence III (Faumont et al., 2009), seraient responsables de la régulation de ces trois cytokines immunosuppressives. De plus, c-Myc et NF- κ B sont également impliqués dans la régulation de PD-L1, c-Myc régule négativement PD-L1 (Durand-Panteix et al., 2012) alors que NF- κ B positivement (Fang et al., 2014). Nous formulons l'hypothèse que l'activation de NF- κ B (par la stimulation du TLR9) dans les cellules B sur-exprimant c-Myc serait capable de réguler l'immunogénicité de la cellule avec l'acquisition d'un phénotype « B régulateur » permettant l'échappement des cellules B tumorales au système immunitaire lors de la lymphomagenèse. La démonstration de cette hypothèse fait partie des perspectives de ce travail.

La stimulation du TLR9 dans les souris λ c-Myc a un effet sur les cellules B, et a également un effet direct ou indirect sur l'ensemble des cellules du système immunitaire. La balance des facteurs pro- et anti-tumorigènes est très importante dans l'initiation de la lymphomagenèse. L'immunosurveillance permet de limiter la prolifération des cellules tumorales. Ainsi une immunosuppression permet l'émergence d'un clone tumoral. L'échappement à la réponse immune est une étape essentielle à la transformation maligne. La stimulation du TLR9 permet d'activer la voie NF- κ B, la transcription de gène médiée par NF- κ B est connue pour être un régulateur clé de l'expression de nombreuses cytokines qui influencent les propriétés des cellules lymphoïdes et myéloïdes dans le microenvironnement tumoral. L'activation de NF- κ B pourrait donc moduler la cellule tumorale et son microenvironnement immun pour échapper à la pression du système immunitaire et ainsi permettre l'émergence d'un clone tumoral.



Chapitre III. Discussions, perspectives et conclusions.

Durant ces travaux de thèse, nous avons soulevé la question de l'effet de c-Myc dans les cellules B avec une activation de NF- κ B grâce à trois inducteurs différents : le programme de latence III du virus d'Epstein-Barr, la stimulation du TLR9 et un signal constitutif du CD40. Nous avons ainsi réalisé différentes expérimentations que ce soit *in vitro* avec le modèle cellulaire P493-6 (Pajic et al., 2000), et *in vivo* avec les modèles murins λ c-Myc (Kovalchuk et al., 2000), L.CD40 (Hömig-Hölzel et al., 2008) et un modèle double transgénique « L.CD40/ λ c-Myc ».

III.1. NF- κ B et c-Myc.

Dans nos études *in vitro*, nous avons utilisé une lignée cellulaire, P493-6, pour laquelle nous pouvons induire l'expression d'EBNA2 et en conséquence l'ensemble des gènes de la latence III de l'EBV (Pajic et al., 2000). Grâce à l'étude du profil d'expression des gènes et divers tests fonctionnels (prolifération : BrdU et Ki67, apoptose : annexine V) sur cette lignée, nous avons montré qu'*in vitro* l'ajout de c-Myc aux cellules exprimant la latence III de l'EBV favorise la croissance cellulaire avec une prolifération et un métabolisme accru, tandis que les gènes impliqués dans la surveillance immunitaire et/ou la réponse inflammatoire ou la voie des interférons sont réprimés. L'effet coopératif observé est dépendant de NF- κ B puisque son inhibition bloque l'avantage prolifératif des cellules en latence III de l'EBV surexprimant c-Myc. Pour valider ces résultats obtenus sur la lignée P493-6, nous avons utilisé deux lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) classiques, la lignée PRI et une lignée récemment établie au laboratoire. Ces deux LCLs ont été transfectées par une construction contenant le gène c-Myc sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. Nous avons ainsi montré que la surexpression de c-Myc dans ces LCLs permettait également d'augmenter la prolifération des cellules B infectées par l'EBV. Cependant, une surexpression trop élevée de c-Myc dans ces cellules B induit une diminution de la prolifération cellulaire, sûrement due à une augmentation de l'apoptose (résultats non montrés). Il est connu que c-Myc peut activer la prolifération mais est également capable d'induire l'apoptose des cellules (Nilsson and Cleveland, 2003). En conclusion, il apparaît que le niveau d'expression de c-Myc soit un critère important pour induire un effet coopératif avec l'EBV. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie NF-



κ B tel que le PHA408 nous permettrait de confirmer l'implication de cette voie dans cette augmentation de la prolifération

Dans le modèle E μ -Myc, l'activation de NF- κ B, *via* IKK β , est délétère *ex vivo* pour des lignées B murines issues de tumeur surexprimant c-Myc (Klapproth et al., 2009). Dans ce papier, le groupe de T Wirth s'intéresse uniquement au stade tumoral, *i.e.* lorsque la tumeur est établie. Au contraire, nos expériences qui sont réalisées au stade pré-tumoral indiquent que NF- κ B et c-Myc sont compatibles pour transformer les cellules B dans le modèle λ c-Myc (Arnaud et al., 2017). Des résultats de l'équipe ont également confirmé que la stimulation du TLR9 au stade tumoral n'induisait pas d'augmentation de la prolifération des cellules B issues du modèle murin λ c-Myc, et au contraire pouvait avoir un effet délétère (résultats non publiés). La temporalité d'action des facteurs NF- κ B et c-Myc est donc très importante avec un effet coopératif uniquement aux stades précoces de la transformation B (*i.e.* stade pré-tumoral). Voir la discussion sur le lymphome de Burkitt dans le paragraphe III.3.

Dans le modèle P493-6, l'activation de MYD88, *via* le récepteur de l'immunité TLR9, entraîne une augmentation de la prolifération des cellules surexprimant c-Myc. L'activation constitutive de MYD88 suite à une mutation est fréquemment retrouvée dans les lymphomes B agressifs avec une activation constitutive de NF- κ B, tel que les ABC-DLBCL (Ngo et al., 2011). La stimulation du TLR9 n'active pas seulement la voie NF- κ B, mais également la voie MAPK (Krieg, 2002). Pour montrer, l'implication de NF- κ B dans l'augmentation observée de la prolifération des cellules, nous avons inhibé NF- κ B et observé la perte de cette augmentation de la prolifération. En conclusion, c-Myc et NF- κ B coopèrent dans ce modèle cellulaire pour conférer un avantage prolifératif aux cellules. Pour aller plus loin dans l'étude de l'activation de NF- κ B dans un contexte de surexpression de c-Myc, nous avons étudié la stimulation du TLR9 dans le modèle murin transgénique λ c-Myc. Nous avons ainsi montré qu'au stade pré-tumoral (4-5 semaines), la stimulation du TLR9 induisait une augmentation de la prolifération des cellules B de la rate (*in vivo* et *ex vivo*) ainsi qu'une splénomégalie accrue. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, l'expression de la protéine mutée MYD88 (L252P) (équivalent murin de la mutation L265P) dans les cellules de foie fœtal des souris E μ -Myc accélère l'apparition de tumeurs après transplantation dans des souris irradiées (Knittel et al.,

2016). L'activation du TLR9 est connue pour augmenter la prolifération des cellules B et leur activation (Krieg, 2002). Afin de valider l'implication de NF- κ B dans la synergie observée entre la stimulation du TLR9 et la surexpression de c-Myc dans ce modèle, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de la voie NF- κ B.

Nous avons couplé le modèle murin λ c-Myc avec le modèle L.CD40. Le modèle double transgénique « L.CD40/ λ c-Myc » indique que le signal CD40 associé à une surexpression du facteur c-Myc conduit à une tumorigenèse plus agressive. L'architecture des tissus lymphoïdes a été perdue avec une infiltration tumorale massive et l'indice de prolifération Ki67 est élevé (>90%). Les cellules de ce lymphome sont hautement atypiques, de grandes tailles et irrégulières, avec un cytoplasme abondant, de gros noyaux généralement situés à la périphérie de la cellule et évoquant l'aspect des lymphomes immunoblastiques proches des ABC-DLBCL humains. L'analyse transcriptomique des cellules B tumorales nous a permis de montrer que l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et en faveur d'un métabolisme élevé était augmentée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude du transcriptome des P493-6.

Chez les souris L.CD40/ λ c-Myc, nous avons également observé une diminution de l'expression des marqueurs CD19 et CD22 associées aux BCR, de deux molécules de la signalisation du BCR (CD79a et BANK1 (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*)), ainsi que de la molécule normalement exprimée dans les cellules B du centre germinal (BCL11a). Cela évoque une caractéristique des cellules B avec un engagement partiel dans la différenciation plasmocytaire. La faible expression du CD19 pourrait également être le résultat de l'utilisation des souris CD19-Cre (Rickert et al., 1997). La diminution d'expression de BANK1, par un mécanisme de translocation au locus IGH, peut promouvoir la lymphomagenèse des cellules B (Yan et al., 2014). Une étude récente a montré que l'ablation du BCR dans des cultures primaires de lymphome B (modèle murin λ c-Myc) ne perturbe pas la croissance de cellules B de lymphome transformées par c-Myc à la fois *in vitro* et *in vivo* (Varano et al., 2017). Dans les lymphomes induits par c-Myc, l'acquisition d'un statut indépendant du BCR s'accompagne d'une amélioration de l'expression du gène c-Myc, affectant principalement le métabolisme des cellules tumorales (Varano et al., 2017). Comme nous l'avons observé dans nos expérimentations, les souris du modèle L.CD40/ λ c-Myc ont une augmentation



d'expression des gènes impliqués dans la voie de transduction RAS. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Varano et collaborateurs, suggérant que l'activation constitutive RAS/MAPK contourne l'exigence d'un axe fonctionnel BCR/PI3K. Outre ces gènes, nous pouvons noter une diminution de la signature des cellules T et de la réponse aux interférons. Cette diminution peut être mise en partie en relation avec une régulation à la hausse de PDL-1 (cf III.4). Ce phénotype agressif pourrait être en lien avec une diminution de la surveillance immune. L'étude du microenvironnement tumoral serait intéressante dans ce modèle « L.CD40/ λ c-Myc ». Cependant, nous n'avons obtenu que 4 souris de ce génotype. Nous pensons que la faible fréquence d'obtention du modèle serait due à l'agressivité de ce phénotype. Pour pallier à ce problème, un modèle inductible pour c-Myc a été développé « Tet.c-Myc + rtTa ». Ce modèle permet d'induire l'expression de c-Myc dans les cellules B grâce à la doxycycline. En couplant ce modèle avec les souris L.CD40, nous pourrions induire c-Myc dans un contexte d'activation de NF- κ B.

Les gènes fréquemment mutés dans les ABC-DLBCL tels que *prdm1*, *tnfaip3*, *myd88*, *bcl2* ou encore *bcl6* ont fait l'objet de modèle murin (Calado et al., 2010; Cattoretti et al., 2005; Chu et al., 2011; Knies et al., 2015; Knittel et al., 2016), cependant ces gènes n'ont pas été systématiquement combinés pour imiter le paysage mutationnel observé chez ABC-DLBCL humain. Par exemple, la mutation oncogénique MYD88 (L265P) est fréquemment associée avec des altérations CD79A/B, des mutations *tnfaip3*, et des altérations CARD11 (Ngo et al., 2011). L'établissement d'un modèle murin présentant la mutation fréquemment retrouvés dans les ABC-DLBCL, CD79B (Y196H) (Davis et al., 2010) couplé au modèle murin MYD88 (L265P) pourrait permettre d'étudier la coopération et l'interdépendance de ces deux voies dans la lymphomagenèse des ABC-DLBCL (Young et al., 2015).

III.2. Les co-sigaux de la transformation associée à NF- κ B.

Les trois inducteurs de la voie NF- κ B que nous avons utilisés, la latence III de l'EBV, TLR9 et CD40, activent la voie NF- κ B mais également d'autres voies de signalisation. Tout d'abord, LMP1 est également capable d'activer les voies MAPK et PI3K/AKT (pour revue : (Kieser and Sterz, 2015)). Dans la latence III, l'ensemble des protéines de latence est exprimé, comme par exemple LMP2A. Cette protéine est un mimétique du BCR et permet également l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT (pour revue : (Pang et al., 2009)). La signalisation induite par le TLR9 n'implique pas seulement NF- κ B, l'activation de ce récepteur de l'immunité



active également les voies MAPK et JNK (Blasius and Beutler, 2010). Dans le même temps, la famille des facteurs régulateurs des interférons (IRF) est également recrutée *via* une autre voie provoquant la production d'interférons de type I (Kawai and Akira, 2010). L'activation du CD40 permet également l'activation de la voie MAPK et PI3K/AKT (Grammer and Lipsky, 2000). La voie PI3K/AKT affecte la survie cellulaire, l'apoptose, la prolifération et l'instabilité génomique *via* ses protéines cibles en aval, et ainsi participe à la tumorigenèse (Vogt et al., 2010; Zhao and Vogt, 2008). Il a également été démontré que l'activation de la voie PI3K/AKT peut entraîner une résistance à la chimiothérapie (Falasca, 2010). Ainsi, l'inhibition de cette voie peut augmenter l'efficacité thérapeutique des cancers associés à l'EBV (Falasca, 2010). Comme nous avons pu le voir dans l'introduction bibliographique, la voie PI3K/AKT est retrouvée activée dans divers lymphomes B, tel que le lymphome de Burkitt (Limon and Fruman, 2010; Schmitz et al., 2012), le lymphome de Hodgkin (Vockerodt et al., 2013), la maladie de Waldenström (Cao et al., 2015) et les DLBCL (Lenz et al., 2008). La surexpression de c-Myc couplé à l'expression d'une forme constitutivement active de PI3K (P110*) induit un lymphome proche des lymphomes de Burkitt (Sander et al., 2012). La voie p38 MAPK est nécessaire pour l'expression des gènes induits par le CD40 et la prolifération dans les lymphocytes B normaux (Craxton et al., 1998). La voie p38 MAPK est impliquée dans la lymphomagenèse B (Ogasawara et al., 2003). L'activation constitutive de cette voie dans les DLBCL est associée à un facteur de risque de faible réponse à la thérapie CHOP (Vega et al., 2015). L'activation de la voie p38 MAPK apparaît comme un mécanisme majeur de la prolifération cellulaire rapide et de la résistance des cellules tumorales aux médicaments cytotoxiques. La voie ERK est également une voie activée par le CD40, elle a également des effets sur la régulation de l'apoptose par la phosphorylation post-traductionnelle de molécules telles que Bad, Bim, Mcl-1 et Caspase 9 (Steelman et al., 2004). Cette voie a divers effets qui peuvent aussi réguler la progression du cycle cellulaire ou la différenciation. Dans le modèle murin L.CD40, ERK est constitutivement phosphorylée et son inhibition *ex vivo* dans les cellules abroge l'avantage prolifératif conféré par l'expression de L.CD40 dans les cellules (Hömig-Hölzel et al., 2008). Dans le lymphome de Hodgkin, la voie ERK est activée de façon constitutive (Zheng et al., 2003). Cette activation est due aux CD40, CD30 et RANK et permet la régulation de la prolifération cellulaire et de la survie. L'inhibition de cette voie a un effet antiprolifératif sur ces cellules tumorales. Dans des lignées cellulaires de DLBCL (OCI-Ly01 et OCI-Ly10), la perte de IRF8, *in vitro* et *in vivo*, réduit la phosphorylation de p38 et ERK, et a un

effet néfaste sur la croissance des cellules tumorales. L'activation de IRF8 est associée aux DLBCL de type non GC (Xu et al., 2015). Au vu des autres voies de signalisations induites, celle-ci pourraient avoir un rôle dans la tumorigenèse observée dans nos modèles d'études.

III.3. NF- κ B et le lymphome de Burkitt : place du TLR9.

La question du TLR9 dans le Burkitt est intéressante. Le TLR9 est fortement exprimé par les cellules B de ce lymphome (Henault et al., 2005). Ce récepteur de l'immunité innée est capable de reconnaître l'ADN de l'EBV ou encore de l'agent causal de la Malaria, *Plasmodium falciparum* (Gowda et al., 2012; Ning, 2011). Pour rappel, ces deux agents infectieux sont associés à plus de 90% des cas de lymphome de Burkitt endémique d'Afrique équatoriale. On peut donc penser que la stimulation du TLR9 dans ce lymphome est chronique. Le TLR9 permet l'activation de NF- κ B (Zauner and Nadal, 2012), stimule la prolifération dépendante de l'EBV dans les lignées lymphoblastoïdes (Iskra et al., 2010), et bloque l'induction du cycle lytique de l'EBV dans des lignées dérivées de lymphomes de Burkitt favorisant ainsi l'état latent du virus et par la même le maintient ses propriétés transformantes (Zauner et al., 2010). Il existe un polymorphisme du TLR9 qui favoriserait le risque de lymphomes B non-Hodgkinien (Rahman et al., 2014). En fonction de ce polymorphisme, les cellules de lignées de lymphomes de Burkitt sont insensibles à l'apoptose induite par l'activation du TLR9 (Noack et al., 2012). L'ensemble de ces données de la littérature indique qu'un signal TLR9 pourrait-être un co-signal transformant dans le lymphome de Burkitt. Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre I.2.6.1.3, la faible expression de NF- κ B est la signature du lymphome de Burkitt (Dave et al., 2006; Hummel et al., 2006). Dans le modèle E μ -Myc, l'activation de NF- κ B diminue la lymphomagenèse (Klapproth et al., 2009). Pourtant, d'autres études montrent que NF- κ B semble donner un avantage sélectif aux cellules en les protégeant contre l'apoptose (Jazirehi et al., 2005; Piva et al., 2005; Rath and Aggarwal, 2001). Dans nos études utilisant le modèle λ c-Myc, l'activation de NF- κ B permet de potentialiser la lymphomagenèse au stade pré-tumoral. En prenant en compte toutes ces données, il semblerait que NF- κ B pourrait avoir un rôle dans les phases précoces de la pathologie du lymphome de Burkitt en favorisant la prolifération des cellules B et la transformation dépendante de c-Myc. Ensuite, c-Myc prendrait le relais et réprimerait NF- κ B lorsque la maladie serait installée.



III.4. Le microenvironnement tumoral.

Pour compléter cette étude, nous avons obtenu des résultats préliminaires sur les modifications du microenvironnement immun de la cellule B au stade pré-tumoral suite à la stimulation du TLR9. Ces résultats ont été discutés dans la partie II.2.3.2. Nous avons ainsi montré qu'après stimulation du TLR9 par des ODN-CpG, le microenvironnement immunitaire était modifié. En effet, les pourcentages des populations de polynucléaires, de macrophages et de cellules dendritiques sont augmentées alors que ceux des populations de cellules T et NK (*natural killers*) sont diminuées. Dans ce modèle, la surexpression de l'oncogène c-Myc favorise l'afflux de cellules de l'immunité innée en présence ou pas d'ODN-CpG pour stimuler le TLR9. Ce résultat suggère qu'une cellule B avec dérégulation de c-Myc est en permanence surveillée par le système immunitaire. Malgré ce dernier, les souris λ c-Myc présentent une splénomégalie supérieure aux souris sauvages lors de l'addition d'ODN-CpG. Trois hypothèses qui ne s'excluent pas, peuvent être énoncées pour expliquer ces résultats : *i*) l'effet pro-proliférant de la stimulation TLR9 sur les cellules B λ c-Myc est supérieur au contrôle par le système immunitaire ; *ii*) les macrophages et les neutrophiles recrutés favorisent la croissance tumorale par la sécrétion de facteurs tels que l'IL10, le TGF β , le VEGF ou des radicaux libres oxygénés ; et enfin *iii*) la stimulation du TLR9 modifie l'immunogénicité de la cellule B λ c-Myc en augmentant l'expression de molécules immunosuppressives telles que PDL-1 (pouvant expliquer l'absence d'activation T CD8⁺). Notons que les résultats de l'équipe indiquent que l'EBV/LMP1, ainsi que l'activation constitutive du CD40 augmente l'expression de PDL-1. Un signal fort NF- κ B pourrait donc participer à la diminution/perte de l'immunosurveillance de la cellule B λ c-Myc. Ces hypothèses devront être vérifiées.

Chez les patients atteints, plusieurs indices indiquent qu'une meilleure réponse immune spécifique est corrélée avec un meilleur pronostic de survie, et qu'à l'inverse, un patient immunodéprimé est un terrain favorable aux développements de cancer, comme par exemple le lymphome de Burkitt, les DLBCL ou encore les lymphoproliférations post-transplantation (pour revue : (Shain et al., 2015)). La réponse anti-tumorale est une collaboration complexe entre les différents membres de l'immunité innée (les cellules dendritiques, les cellules NK, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles), et de l'immunité adaptative (lymphocytes T). Ces cellules, au sein du microenvironnement tumoral ont des rôles directs ou indirects qui vont permettre de lutter contre les cellules tumorales.



Les mécanismes d'évasion des cellules B malignes comprennent *i*) une expression altérée de molécules de surface qui sont impliqués dans la reconnaissance par les cellules immunitaires (provoquant une immunogénicité réduite et un échappement à la surveillance immune) (Challa-Malladi et al., 2011; Riemersma et al., 2000), *ii*) des défauts de la formation de la synapse immunologique (Ramsay et al., 2009), et *iii*) des défauts dans le bon déroulement des points de contrôle immunitaire par le microenvironnement tumoral (Andorsky et al., 2011; Ramsay et al., 2012).

Afin d'initier une réponse fonctionnelle, les cellules T exigent la présentation des antigènes *via* le CMH par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. Les patients atteints de DLBCL qui ne disposent pas de CMH de classe II sur les cellules tumorales (environ 26% des DLBCL) ont également une diminution des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (LTC) infiltrant les tumeurs (Jesionek-Kupnicka et al., 2016; Rimsza et al., 2004). Une diminution de la présentation par le CMH de classe II peut être due à de multiples mécanismes comme la délétion de gène du CMH de classe II (Riemersma et al., 2000). La réduction de l'expression du CMH de classe II à la surface des cellules tumorales provoque une diminution de la présentation de l'antigène par le CMH de classe II et réduit ainsi l'activation des Lymphocytes T *helper* CD4⁺, qui activent les LTC. On peut également noter que dans les ABC-DLBCL, les cellules tumorales présentent un engagement partiel dans la différenciation vers le stade plasmocytaire connu pour la perte d'expression du CMH II (Wilkinson et al., 2012). De plus, des mutations dans la β 2-microglobuline (B2M ; indispensable pour l'assemblage du CMH I) dans 30% des patients DLBCL induit une diminution de l'expression du CMH I à la surface cellulaire, améliorant ainsi la capacité des cellules de DLBCL à échapper à la reconnaissance par les LTC (Challa-Malladi et al., 2011). Des cellules dépourvues de l'expression du CMH I sont généralement les cibles des cellules NK par l'engagement du CD58/LFA-3 (*lymphocyte function-associated antigen 3*). Or, des mutations qui perturbent le CD58 (20% des patients DLBCL) contribuent à l'évasion vis-à-vis des cellules NK. Des aberrations génétiques supplémentaires identifiées dans les DLBCL impliquent les molécules de co-stimulation telles que CD86 (Stopeck et al., 2000). La perte d'expression du CD86 diminue le nombre de cellules T CD8⁺ infiltrant la tumeur dans les DLBCL. Il semble donc clair que l'échappement des cellules tumorales à la reconnaissance des lymphocytes T est essentiel pour la progression de la maladie.



Les cellules tumorales de DLBCL sont également capables d'altérer la formation des synapses immunologiques des lymphocytes T (Ramsay et al., 2009). Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs de DLBCL présentent une réduction significative de la formation de synapses immunologiques. Ce défaut des lymphocytes T est associé à la suppression du recrutement des protéines critiques impliquées dans la signalisation de la synapse tel que la F-actine. La modification de la motilité des cellules T est également un mécanisme d'altération de la formation de la synapse immunologique (Ramsay et al., 2008). La migration entraînée par LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) est essentielle pour la surveillance immunitaire et le recrutement de cellules T dans la tumeur. Cette protéine permet l'extravasation des cellules T vers le microenvironnement lymphoïde *via* des veinules endothéliales exprimant ICAM-1. La suppression de l'induction des lymphocytes T par les cellules B malignes réduit les fonctions d'activation et effectrices des LTC, ainsi que leur dégranulation (Ramsay et al., 2012).

L'induction des ligands de PD-1 (*Programmed Cell Death 1*), PDL-1 et 2, dans le microenvironnement tumoral a des implications importantes pour l'évasion immunitaire. Quand PD-1 est engagé sur les lymphocytes T activées, il induit la signalisation inhibitrice en formant des microclusters de co-signalisation qui inhibent directement la signalisation du TCR par le recrutement de la phosphatase inhibitrice PTPN11 (*Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11*) et PP2A (*Protein phosphatase 2*) (Yokosuka et al., 2012). Des mutations affectant PD-L1 et PD-L2 ont également été identifiées dans les DLBCL, permettant une surexpression des ligands de PD-1 (Pasqualucci et al., 2011). Outre ces mutations, l'expression des ligands de PD-1 sur les cellules B tumorales peut faire suite à la stimulation par des cytokines, en particulier l'IFN- γ qui est produite par l'activation des lymphocytes T *helper* CD4⁺, des T CD8⁺ et des cellules NK (Schreiber et al., 2011).

III.5. Conclusions.

L'objectif de ma thèse aura été de montrer la synergie, la coopération entre une signalisation NF- κ B et c-Myc dans le développement tumoral B. Nous avons ainsi mis en évidence que ce soit *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, que NF- κ B et c-Myc permettent d'augmenter la prolifération des cellules B, d'accélérer la lymphomagenèse et l'agressivité des lymphomes. Ces résultats ont été obtenus avec trois inducteurs de la voie NF- κ B (Latence III de l'EBV, TLR9 et CD40). Ce travail démontre au travers de ces différents modèles que la lymphomagenèse



dépendante de NF- κ B dans les lymphomes agressifs de type DLBCL implique plusieurs événements transformants et identifie la dérégulation de c-Myc comme une voie oncogène clé impliquée dans l'évolution péjorative de la maladie.



Références bibliographiques

Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 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.

Affer, M., Chesi, M., Chen, W.D., Keats, J.J., Demchenko, Y.N., Tamizhmani, K., Garbitt, V.M., Riggs, D.L., Brents, L.A., Roschke, A.V., et al. (2014). Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* *28*, 1725–1735.

Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M., et al. (1999). A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* *18*, 5785–5794.

Albert, T., Urlbauer, B., Kohlhuber, F., Hammersen, B., and Eick, D. (1994). Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* *9*, 759–763.

de Alborán, I.M., Baena, E., and Martinez-A, C. (2004). c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ.* *11*, 61–68.

Aldinucci, D., Celegato, M., and Casagrande, N. (2016). Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Lett.* *380*, 243–252.

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.

Allday, M.J. (2009). How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin. Cancer Biol.* *19*, 366–376.

Allen, J.M., Forbush, K.A., and Perlmutter, R.M. (1992). Functional dissection of the Ick proximal promoter. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 2758–2768.

Amin, R., Marfak, A., Pangault, C., Oblet, C., Chanut, A., Tarte, K., Denizot, Y., and Cogné, M. (2014). The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget* *5*, 8995–9006.

Andorsky, D.J., Yamada, R.E., Said, J., Pinkus, G.S., Betting, D.J., and Timmerman, J.M. (2011). Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 4232–4244.



Andreeff, M., Jiang, S., Zhang, X., Konopleva, M., Estrov, Z., Snell, V.E., Xie, Z., Okcu, M.F., Sanchez-Williams, G., Dong, J., et al. (1999). Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* *13*, 1881–1892.

Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* *12*, 115–130.

Annweiler, A., Müller, U., and Wirth, T. (1992). Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* *20*, 1503–1509.

Ansell, S.M., Stenson, M., Habermann, T.M., Jelinek, D.F., and Witzig, T.E. (2001). Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *19*, 720–726.

Arnaud, N., David, A., Fradet, M., Lascaux, H., Ouk-Martin, C., Gachard, N., Zimmer-Strobl, U., Feuillard, J., and Faumont, N. (2017). c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- κ B activated B cells. *Haematologica* *102*, 883–894.

Arnold, H.K., and Sears, R.C. (2008). A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer Metastasis Rev.* *27*, 147–158.

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

Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Intergroupe Francophone du Myélome (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* *98*, 3082–3086.

Azzaoui, I., Uhel, F., Rossille, D., Pangault, C., Dulong, J., Le Priol, J., Lamy, T., Houot, R., Le Gouill, S., Cartron, G., et al. (2016). T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *128*, 1081–1092.

Baens, M., Fevery, S., Sagaert, X., Noels, H., Hagens, S., Broeckx, V., Billiau, A.D., De Wolf-Peeters, C., and Marynen, P. (2006). Selective expansion of marginal zone B cells in Emicro-API2-MALT1 mice is linked to enhanced IkappaB kinase gamma polyubiquitination. *Cancer Res.* *66*, 5270–5277.

Baker, S.J., Pawlita, M., Leutz, A., and Hoelzer, D. (1994). Essential role of c-myc in ara-C-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Leukemia* *8*, 1309–1317.

Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L.-A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., Larrayoz, M., Kminkova, J., Agathangelidis, A., Davis, Z., et al. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *29*, 329–336.



Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Royer, H.D., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1996). High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87, 4340–4347.

Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., et al. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* 100, 2961–2969.

Barth, C.F., Ewert, D.L., Olson, W.C., and Humphries, E.H. (1990). Reticuloendotheliosis virus REV-T(REV-A)-induced neoplasia: development of tumors within the T-lymphoid and myeloid lineages. *J. Virol.* 64, 6054–6062.

Barth, T.F.E., Martin-Subero, J.I., Joos, S., Menz, C.K., Hasel, C., Mechttersheimer, G., Parwaresch, R.M., Lichter, P., Siebert, R., and Möller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 3681–3686.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172–184.

Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995a). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167–170.

Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., and Baltimore, D. (1995b). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev.* 9, 2736–2746.

Beier, R., Bürgin, A., Kiermaier, A., Fero, M., Karsunky, H., Saffrich, R., Möröy, T., Ansorge, W., Roberts, J., and Eilers, M. (2000). Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J.* 19, 5813–5823.

Beinke, S., and Ley, S.C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 382, 393–409.

Bell, A.C., West, A.G., and Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387–396.

Bendall, H.H., Sikes, M.L., Ballard, D.W., and Oltz, E.M. (1999). An intact NF-kappa B signaling pathway is required for maintenance of mature B cell subsets. *Mol. Immunol.* 36, 187–195.

Bergsagel, P.L., Mateos, M.-V., Gutierrez, N.C., Rajkumar, S.V., and San Miguel, J.F. (2013). Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 121, 884–892.

Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* 30, 689–700.



Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., and Magrath, I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat. Genet.* *5*, 56–61.

Biegging, K.T., Amick, A.C., and Longnecker, R. (2009). Epstein-Barr virus LMP2A bypasses p53 inactivation in a MYC model of lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17945–17950.

Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* *196*, 254–265.

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* *250*, 1149–1151.

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.

Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* *32*, 305–315.

Blonska, M., and Lin, X. (2009). CARMA1-mediated NF-kappaB and JNK activation in lymphocytes. *Immunol. Rev.* *228*, 199–211.

Blum, K.A., Lozanski, G., and Byrd, J.C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* *104*, 3009–3020.

Bohers, E., Mareschal, S., Bertrand, P., Viailly, P.J., Dubois, S., Maingonnat, C., Ruminy, P., Tilly, H., and Jardin, F. (2015). Activating somatic mutations in diffuse large B-cell lymphomas: lessons from next generation sequencing and key elements in the precision medicine era. *Leuk. Lymphoma* *56*, 1213–1222.

Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C., et al. (2004). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* *23*, 4202–4210.

Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.-C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol.* *5*, 1052–1060.

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.

Bours, V., Villalobos, J., Burd, P.R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1990). Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* *348*, 76–80.

Bours, V., Burd, P.R., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R.P., Bravo, R., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1992). A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 685–695.



Bräuning, A., Wacker, H.-H., Rajewsky, K., Küppers, R., and Hansmann, M.-L. (2003). Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* *63*, 1644–1651.

Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, 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.

Brown, K.D., Hostager, B.S., and Bishop, G.A. (2001). Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J. Exp. Med.* *193*, 943–954.

Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M.B., Dirac, A.M.G., and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* *424*, 797–801.

Buchner, M., Fuchs, S., Prinz, G., Pfeifer, D., Bartholomé, K., Burger, M., Chevalier, N., Vallat, L., Timmer, J., Gribben, J.G., et al. (2009). Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* *69*, 5424–5432.

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

Caamaño, J.H., Rizzo, C.A., Durham, S.K., Barton, D.S., Raventós-Suárez, C., Snapper, C.M., and Bravo, R. (1998). Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J. Exp. Med.* *187*, 185–196.

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.

Cai, Q., Medeiros, L.J., Xu, X., and Young, K.H. (2015). MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget* *6*, 38591–38616.

Calado, D.P., Zhang, B., Srinivasan, L., Sasaki, Y., Seagal, J., Unitt, C., Rodig, S., Kutok, J., Tarakhovsky, A., Schmidt-Supprian, M., et al. (2010). Constitutive canonical NF-κB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* *18*, 580–589.

Cao, X., Bennett, R.L., and May, W.S. (2008). c-Myc and caspase-2 are involved in activating Bax during cytotoxic drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 14490–14496.

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.



Cao, Y., Hunter, Z.R., Liu, X., Xu, L., Yang, G., Chen, J., Patterson, C.J., Tsakmaklis, N., Kanan, S., Rodig, S., et al. (2015). The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia* 29, 169–176.

Cárdenas, D., Vélez, G., Orfao, A., Herrera, M.V., Solano, J., Olaya, M., Uribe, A.M., Saavedra, C., Duarte, M., Rodríguez, M., et al. (2015). Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T lymphocytes from diffuse large B cell lymphoma patients are functionally impaired. *Clin. Exp. Immunol.* 182, 173–183.

Cariappa, A., Liou, H.C., Horwitz, B.H., and Pillai, S. (2000). Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 192, 1175–1182.

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.

Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S.V., Shen, Q., Mo, T., Murty, V.V., and Dalla-Favera, R. (2005). Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 7, 445–455.

Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342–7351.

Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2011). Combined Genetic Inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 20, 728–740.

Chang, D.W., Claassen, G.F., Hann, S.R., and Cole, M.D. (2000). The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4309–4319.

Chang, K.-C., Huang, G.-C., Jones, D., and Lin, Y.-H. (2007). Distribution Patterns of Dendritic Cells and T Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphomas Correlate with Prognoses. *Clin. Cancer Res.* 13, 6666–6672.

Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 6, 1670–1690.

Chanudet, E., Huang, Y., Ichimura, K., Dong, G., Hamoudi, R.A., Radford, J., Wotherspoon, A.C., Isaacson, P.G., Ferry, J., and Du, M.-Q. (2010). A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* 24, 483–487.

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. (2014). RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia* 28, 871–879.



Chapiro, E., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Luquet, I., Lefebvre, C., Callet-Bauchu, E., Leroux, D., Talmant, P., Mozziconacci, M.-J., Mugneret, F., et al. (2008). The most frequent t(14;19)(q32;q13)-positive B-cell malignancy corresponds to an aggressive subgroup of atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22, 2123–2127.

Chen, C.L., Singh, N., Yull, F.E., Strayhorn, D., Van Kaer, L., and Kerr, L.D. (2000). Lymphocytes lacking I kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 5418–5427.

Chen, I.S., Wilhelmssen, K.C., and Temin, H.M. (1983). Structure and expression of c-rel, the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T. *J. Virol.* 45, 104–113.

Cheng, L., Zhang, Z., Li, G., Li, F., Wang, L., Zhang, L., Zurawski, S.M., Zurawski, G., Levy, Y., and Su, L. (2017). Human innate responses and adjuvant activity of TLR ligands in vivo in mice reconstituted with a human immune system. *Vaccine*.

Chesi, M., and Bergsagel, P.L. (2015). Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int. J. Lab. Hematol.* 37 *Suppl 1*, 108–114.

Chesi, M., Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., et al. (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* 13, 167–180.

Cheung, W.C., Kim, J.S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R.D., and Janz, S. (2004). Novel targeted deregulation of c-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.

Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 352, 804–815.

Chng, W.-J., Huang, G.F., Chung, T.H., Ng, S.B., Gonzalez-Paz, N., Troska-Price, T., Mulligan, G., Chesi, M., Bergsagel, P.L., and Fonseca, R. (2011). Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 25, 1026–1035.

Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 270, 18961–18965.

Chu, Y., Vahl, J.C., Kumar, D., Heger, K., Bertossi, A., Wójtowicz, E., Soberon, V., Schenten, D., Mack, B., Reutelshöfer, 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.

Cleveland, J.L., Huleihel, M., Bressler, P., Siebenlist, U., Akiyama, L., Eisenman, R.N., and Rapp, U.R. (1988). Negative regulation of c-myc transcription involves myc family proteins. *Oncogene Res.* *3*, 357–375.

Coffelt, S.B., Tal, A.O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y., et al. (2010). Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res.* *70*, 5270–5280.

Cohen, M., De Matteo, E., Narbaitz, M., Carreño, F.A., Preciado, M.V., and Chabay, P.A. (2013). Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int. J. Cancer* *132*, 1572–1580.

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.

Contri, A., Brunati, A.M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L.A., Zambello, R., Semenzato, G., and Donella-Deana, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J. Clin. Invest.* *115*, 369–378.

Conze, D.B., Zhao, Y., and Ashwell, J.D. (2010). Non-canonical NF-kB activation and abnormal B cell accumulation in mice expressing ubiquitin protein ligase-inactive c-IAP2. *PLoS Biol.* *8*, e1000518.

Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F.H., and Ferran, C. (1996). A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* *271*, 18068–18073.

Coornaert, B., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2009). A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J. Biol. Chem.* *284*, 8217–8221.

Cormier, F., Monjanel, H., Fabre, C., Billot, K., Sapharikas, E., Chereau, F., Bordereaux, D., Molina, T.J., Avet-Loiseau, H., and Baud, V. (2013). Frequent engagement of RelB activation is critical for cell survival in multiple myeloma. *PLoS One* *8*, e59127.

Cornall, R.J., Cyster, J.G., Hibbs, M.L., Dunn, A.R., Otipoby, K.L., Clark, E.A., and Goodnow, C.C. (1998). Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* *8*, 497–508.

Corso, J., Pan, K.-T., Walter, R., Doebele, C., Mohr, S., Bohnenberger, H., Ströbel, P., Lenz, C., Slabicki, M., Hülle, J., et al. (2016). Elucidation of tonic and activated B-cell receptor signaling in Burkitt's lymphoma provides insights into regulation of cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 5688–5693.

- Cortese, D., Sutton, L.-A., Cahill, N., Smedby, K.E., Geisler, C., Gunnarsson, R., Juliusson, G., Mansouri, L., and Rosenquist, R. (2014). On the way towards a “CLL prognostic index”: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia* 28, 710–713.
- Courtois, G., and Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25, 6831–6843.
- Coutinho, R., Clear, A.J., Mazzola, E., Owen, A., Greaves, P., Wilson, A., Matthews, J., Lee, A., Alvarez, R., da Silva, M.G., et al. (2015). Revisiting the immune microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma using a tissue microarray and immunohistochemistry: robust semi-automated analysis reveals CD3 and FoxP3 as potential predictors of response to R-CHOP. *Haematologica* 100, 363–369.
- Craig, F.E., Johnson, L.R., Harvey, S.A.K., Nalesnik, M.A., Luo, J.H., Bhattacharya, S.D., and Swerdlow, S.H. (2007). Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive and -negative monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* 16, 158–168.
- Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G., and Clark, E.A. (1998). p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 3225–3236.
- Crossen, P.E., and Morrison, M.J. (1999). Methylation status of the 3rd exon of the c-MYC oncogene in B-cell malignancies. *Leuk. Res.* 23, 251–253.
- 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.
- Damm, F., Mylonas, E., Cosson, A., Yoshida, K., Della Valle, V., Mouly, E., Diop, M., Scourzic, L., Shiraishi, Y., Chiba, K., et al. (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov.* 4, 1088–1101.
- Dang, C.V., O’donnell, K.A., and Juopperi, T. (2005). The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* 8, 177–178.
- D’Artista, L., Bisso, A., Piontini, A., Doni, M., Verrecchia, A., Kress, T.R., Morelli, M.J., Del Sal, G., Amati, B., and Campaner, S. (2016). Pin1 is required for sustained B cell proliferation upon oncogenic activation of Myc. *Oncotarget*.
- 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, 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.

Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007). [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Médecine Sci. MS* 23, 67–73.

Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098–7108.

Dewald, G.W., Kyle, R.A., Hicks, G.A., and Greipp, P.R. (1985). The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 66, 380–390.

Dhillon, N., and Kamakaka, R.T. (2002). Breaking through to the other side: silencers and barriers. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 188–192.

Dib, A., Gabrea, A., Glebov, O.K., Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2008). Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 25–31.

DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I-kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548–554.

Dixit, V.M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L.B., Wolf, F.W., O'Rourke, K., Ward, P.A., Prochownik, E.V., and Marks, R.M. (1990). Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J. Biol. Chem.* 265, 2973–2978.

Doi, T.S., Marino, M.W., Takahashi, T., Yoshida, T., Sakakura, T., Old, L.J., and Obata, Y. (1999). Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2994–2999.

Durand-Panteix, S., Farhat, M., Youlyouz-Marfak, I., Rouaud, P., Ouk-Martin, C., David, A., Faumont, N., Feuillard, J., and Jayat-Vignoles, C. (2012). B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 181–190.

Duyao, M.P., Kessler, D.J., Spicer, D.B., Bartholomew, C., Cleveland, J.L., Siekevitz, M., and Sonenshein, G.E. (1992a). Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF kappa B. *J. Biol. Chem.* 267, 16288–16291.

Duyao, M.P., Kessler, D.J., Spicer, D.B., and Sonenshein, G.E. (1992b). Transactivation of the c-myc gene by HTLV-1 tax is mediated by NFkB. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 182, 421–424.



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.

Ehl, S., Hombach, J., Aichele, P., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1997). Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J. Exp. Med.* *185*, 1241–1251.

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

Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., et al. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* *94*, 3129–3134.

Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeffker, A., Vry, M.S., Döhner, K., Bommert, K., Stein, H., and Dörken, B. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J. Pathol.* *201*, 413–420.

Epeldegui, M., Hung, Y.P., McQuay, A., Ambinder, R.F., and Martínez-Maza, O. (2007). Infection of human B cells with Epstein-Barr virus results in the expression of somatic hypermutation-inducing molecules and in the accrual of oncogene mutations. *Mol. Immunol.* *44*, 934–942.

Ersing, I., Bernhardt, K., and Gewurz, B.E. (2013). NF-κB and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses* *5*, 1587–1606.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69*, 119–128.

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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *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 c-myc P2 minimal promoter. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 100–114.

Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lyman, E., Farina, A., and Martinez, E. (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10220–10234.

Falasca, M. (2010). PI3K/Akt signalling pathway specific inhibitors: a novel strategy to sensitize cancer cells to anti-cancer drugs. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 1410–1416.



Fang, W., Zhang, J., Hong, S., Zhan, J., Chen, N., Qin, T., Tang, Y., Zhang, Y., Kang, S., Zhou, T., et al. (2014). EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget* 5, 12189–12202.

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., Durand-Panteix, S., Schlee, M., Grömminger, S., Schuhmacher, M., Hölzel, M., Laux, G., Mailhammer, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M., et al. (2009). c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 83, 5014–5027.

Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol. Cell* 4, 199–207.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanenko, V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2802–2813.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–950.

Fish, K., Chen, J., and Longnecker, R. (2014). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. *Blood* 123, 530–540.

Fracchiolla, N.S., Lombardi, L., Salina, M., Migliazza, A., Baldini, L., Berti, E., Cro, L., Polli, E., Maiolo, A.T., and Neri, A. (1993). Structural alterations of the NF-kappa B transcription factor *lyt-10* in lymphoid malignancies. *Oncogene* 8, 2839–2845.

Franzoso, G., Carlson, L., Scharton-Kersten, T., Shores, E.W., Epstein, S., Grinberg, A., Tran, T., Shacter, E., Leonardi, A., Anver, M., et al. (1997). Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity* 6, 479–490.

Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E.W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Scharton-Kersten, T., Anver, M., et al. (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J. Exp. Med.* 187, 147–159.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.

Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., and Kast, W.M. (2001). Mechanism of Immune Dysfunction in Cancer Mediated by Immature Gr-1+ Myeloid Cells. *J. Immunol.* 166, 5398–5406.



- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 253–268.
- Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., and Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* *218*, 1402–1410.
- Gargano, B., Amente, S., Majello, B., and Lania, L. (2007). P-TEFb is a crucial co-factor for Myc transactivation. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 2031–2037.
- Garrison, S.P., Jeffers, J.R., Yang, C., Nilsson, J.A., Hall, M.A., Rehg, J.E., Yue, W., Yu, J., Zhang, L., Onciu, M., et al. (2008). Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5391–5402.
- Gaulard, P., d'Agay, M.F., Peuchmaur, M., Brousse, N., Gisselbrecht, C., Solal-Celigny, P., Diebold, J., and Mason, D.Y. (1992). Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am. J. Pathol.* *140*, 1089–1095.
- Gauld, S.B., Porto, J.M.D., and Cambier, J.C. (2002). B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles in Cell Development and Disease. *Science* *296*, 1641–1642.
- Gélinas, C., and Temin, H.M. (1988). The v-rel oncogene encodes a cell-specific transcriptional activator of certain promoters. *Oncogene* *3*, 349–355.
- 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., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P., and Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* *62*, 1019–1029.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 225–260.
- Gilmore, T.D., and Gerondakis, S. (2011). The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* *2*, 695–711.
- Gilmore, T.D., Kalaitzidis, D., Liang, M.-C., and Starczynowski, D.T. (2004). The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* *23*, 2275–2286.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* *16*, 6131–6140.
- Giulino-Roth, L., Wang, K., MacDonald, T.Y., Mathew, S., Tam, Y., Cronin, M.T., Palmer, G., Lucena-Silva, N., Pedrosa, F., Pedrosa, M., et al. (2012). Targeted genomic sequencing of pediatric Burkitt lymphoma identifies recurrent alterations in antiapoptotic and chromatin-remodeling genes. *Blood* *120*, 5181–5184.



- Gombert, W.M., Farris, S.D., Rubio, E.D., Morey-Rosler, K.M., Schubach, W.H., and Krumm, A. (2003). The c-myc insulator element and matrix attachment regions define the c-myc chromosomal domain. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 9338–9348.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290–294.
- Gottschalk, S., Rooney, C.M., and Heslop, H.E. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu. Rev. Med.* *56*, 29–44.
- Goudeau, B., Huetz, F., Samson, S., Di Santo, J.P., Cumano, A., Beg, A., Israël, A., and Mémet, S. (2003). I κ B α /I κ B ϵ deficiency reveals that a critical NF- κ B dosage is required for lymphocyte survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15800–15805.
- 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. Baltim. Md 1950* *188*, 5073–5085.
- Grammer, A.C., and Lipsky, P.E. (2000). CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv. Immunol.* *76*, 61–178.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K., and Dalla-Favera, R. (1990). Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *EMBO J.* *9*, 3913–3922.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., and Gerondakis, S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J. Exp. Med.* *187*, 663–674.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S. (1999). NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5785–5799.
- Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., et al. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell* *36*, 831–844.
- Hadian, K., Griesbach, R.A., Dornauer, S., Wanger, T.M., Nagel, D., Metlitzky, M., Beisker, W., Schmidt-Supprian, M., and Krappmann, D. (2011). NF- κ B essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* *286*, 26107–26117.
- Hamlyn, P.H., and Rabbitts, T.H. (1983). Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* *304*, 135–139.



Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., and Yang, S.-M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 948098.

Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., and Baldwin, A.S. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* *65*, 1281–1289.

Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* *25*, 6758–6780.

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.

Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-κB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 563–574.

Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Dang, L., et al. (2006). MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5887–5894.

Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dörken, B., Zenke, M., Stein, H., and Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J. Exp. Med.* *196*, 605–617.

Hirotsu, T., Lee, P.Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K. (2005). The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol. Baltim. Md* *174*, 3650–3657.

Ho, L., Davis, R.E., Conne, B., Chappuis, R., Berczy, M., Mhaweche, P., Staudt, L.M., and Schwaller, J. (2005). MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-kappa B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood* *105*, 2891–2899.

Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* *12*, 86.



- Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27, 6462–6472.
- Hojer, C., Frankenberger, S., Strobl, L.J., Feicht, S., Djermanovic, K., Jagdhuber, F., Hömig-Hölzel, C., Ferch, U., Ruland, J., Rajewsky, K., et al. (2014). B-cell expansion and lymphomagenesis induced by chronic CD40 signaling is strictly dependent on CD19. *Cancer Res.* 74, 4318–4328.
- 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.
- Hövelmeyer, N., Wörns, M.A., Reissig, S., Adams-Quack, P., Leclaire, J., Hahn, M., Wörtge, S., Nikolaev, A., Galle, P.R., and Waisman, A. (2014). Overexpression of Bcl-3 inhibits the development of marginal zone B cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 545–552.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284, 316–320.
- Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K., and Karin, M. (2001). IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 410, 710–714.
- 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.
- Hunter, J.E., Butterworth, J.A., Zhao, B., Sellier, H., Campbell, K.J., Thomas, H.D., Bacon, C.M., Cockell, S.J., Gewurz, B.E., and Perkins, N.D. (2015). The NF-κB subunit c-Rel regulates Bach2 tumour suppressor expression in B-cell lymphoma. *Oncogene*.
- Hunter, Z.R., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Manning, R.J., Tripsas, C., Patterson, C.J., Sheehy, P., et al. (2014). The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 123, 1637–1646.
- 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.
- Inoue, S., Leitner, W.W., Golding, B., and Scott, D. (2006). Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* 66, 7741–7747.
- Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13180–13185.
- Isaacson, P.G., and Du, M.-Q. (2004). MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat. Rev. Cancer* 4, 644–653.



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.

Ishikawa, H., Claudio, E., Dambach, D., Raventós-Suárez, C., Ryan, C., and Bravo, R. (1998). Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J. Exp. Med.* *187*, 985–996.

Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H.-J., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by epstein-barr virus. *J. Virol.* *84*, 3612–3623.

Israël, A. (2010). The IKK Complex, a Central Regulator of NF-κB Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.

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.

Ito, T., Wang, Y.-H., and Liu, Y.-J. (2005). Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin. Immunopathol.* *26*, 221–229.

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., and Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12592–12597.

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

Jazirehi, A.R., Huerta-Yepez, S., Cheng, G., and Bonavida, B. (2005). Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor-κB signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* *65*, 264–276.

Jensen, T.O., Schmidt, H., Møller, H.J., Donskov, F., Høyer, M., Sjoegren, P., Christensen, I.J., and Steiniche, T. (2012). Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* *118*, 2476–2485.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.



Jesionek-Kupnicka, D., Bojo, M., Prochorec-Sobieszek, M., Szumera-Ciećkiewicz, A., Jabłońska, J., Kalinka-Warzocho, E., Kordek, R., Młynarski, W., Robak, T., Warzocho, K., et al. (2016). HLA-G and MHC Class II Protein Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *64*, 225–240.

Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G., and Li, X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3533–3538.

Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* *85*, 149–158.

de Jong, S.J., Albrecht, J.-C., Giehler, F., Kieser, A., Sticht, H., and Biesinger, B. (2013). Noncanonical NF-κB activation by the oncoprotein Tio occurs through a nonconserved TRAF3-binding motif. *Sci. Signal.* *6*, ra27.

Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trümper, L., Möller, P., Lichter, P., et al. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* *99*, 1381–1387.

Jourdan, M., Moreaux, J., Vos, J.D., Hose, D., Mahtouk, K., Abouladze, M., Robert, N., Baudard, M., Rème, T., Romanelli, A., et al. (2007). Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br. J. Haematol.* *138*, 160–168.

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 alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* *191*, 395–402.

Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, T., Kawai, T., Nomura, F., Terada, N., and Akira, S. (2001). I kappa B kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J. Exp. Med.* *193*, 417–426.

Kalchschmidt, J.S., Bashford-Rogers, R., Paschos, K., Gillman, A.C.T., Styles, C.T., Kellam, P., and Allday, M.J. (2016). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C directly induces expression of AID and somatic mutations in B cells. *J. Exp. Med.* *213*, 921–928.

Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2003). c-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 c-myc expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J. Biol. Chem.* *275*, 32338–32346.

Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *184*, 1495–1505.

Kapatai, G., and Murray, P. (2007). Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Pathol.* *60*, 1342–1349.



Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 621–663.

Kato, H., Karube, K., Yamamoto, K., Takizawa, J., Tsuzuki, S., Yatabe, Y., Kanda, T., Katayama, M., Ozawa, Y., Ishitsuka, K., et al. (2014). Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci.* *105*, 537–544.

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.

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

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.

Keane, C., Gill, D., Vari, F., Cross, D., Griffiths, L., and Gandhi, M. (2013). CD4+ Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic and independent of R-IPi in patients with DLBCL receiving R-CHOP chemo-immunotherapy. *Am. J. Hematol.* *88*, 273–276.

Keats, J.J., Chesi, M., Egan, J.B., Garbitt, V.M., Palmer, S.E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P.R., Baker, A.S., Dispenzieri, A., et al. (2012). Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* *120*, 1067–1076.

Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* *35*, 603–610.

Kelly, R.J., Wright, D., Patil, K., Chapple, M., Jalihal, S.S., Barrans, S.L., O'Connor, S.J.M., Turner, K., Jack, A.S., and Owen, R.G. (2008). t(14;19)(q32;q13) incidence and significance in B-cell lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* *141*, 561–563.

Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4465–4474.

Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerckhove, J., Lottspeich, F., Le Bail, O., Urban, M.B., Kourilsky, P., Baeuerle, P.A., and Israël, A. (1990). The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* *62*, 1007–1018.

Kieser, A., and Sterz, K.R. (2015). The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *391*, 119–149.

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.



Kirillova, I., Chaisson, M., and Fausto, N. (1999). Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 819–828.

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- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* *114*, 2448–2458.

Kleefstrom, J., Arighi, E., Littlewood, T., Jäättelä, M., Saksela, E., Evan, G.I., and Alitalo, K. (1997). Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF- κ B activation. *EMBO J.* *16*, 7382–7392.

Knaapen, A.M., Gungör, N., Schins, R.P.F., Borm, P.J.A., and Van Schooten, F.J. (2006). Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* *21*, 225–236.

Knies, N., Alankus, B., Weilemann, A., Tzankov, A., Brunner, K., Ruff, T., Kremer, M., Keller, U.B., Lenz, G., and Ruland, J. (2015). Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E7230-7238.

Knittel, G., Liedgens, P., Korovkina, D., Seeger, J.M., Al-Baldawi, Y., Al-Maarri, M., Fritz, C., Vlantis, K., Bezhanova, S., Scheel, A.H., et al. (2016). B cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B cell lymphoma in mice. *Blood*.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 203–229.

Komano, J., Sugiura, M., and Takada, K. (1998). Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* *72*, 9150–9156.

Köntgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* *9*, 1965–1977.

Koschella, M., Voehringer, D., and Pircher, H. (2004). CD40 ligation in vivo induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 4804–4811.

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.

Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israël, A., Wallach, D., and Courtois, G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination. *Nature* *424*, 801–805.

Krappmann, D., and Vincendeau, M. (2016). Mechanisms of NF- κ B deregulation in lymphoid malignancies. *Semin. Cancer Biol.*



Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Dörken, B., and Scheidereit, C. (1999). Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* *18*, 943–953.

Kridel, R., Steidl, C., and Gascoyne, R.D. (2015). Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* *100*, 143–145.

Krieg, A.M. (2000). Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* *19*, 618–622.

Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 709–760.

Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 471–484.

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.

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., et al. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3026–3037.

Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 175–187.

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.

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 I kappa B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 28–40.

Lamason, R.L., McCully, R.R., Lew, S.M., and Pomerantz, J.L. (2010). Oncogenic CARD11 mutations induce hyperactive signaling by disrupting autoinhibition by the PKC-responsive inhibitory domain. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 8240–8250.

Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* *152*, 714–726.



Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., et al. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* *113*, 5412–5417.

Langdon, W.Y., Harris, A.W., and Cory, S. (1989). Acceleration of B-lymphoid tumorigenesis in E mu-myc transgenic mice by v-H-ras and v-raf but not v-abl. *Oncogene Res.* *4*, 253–258.

Le Cloennec, 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.

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.

Lenz, G., and Staudt, L.M. (2010). Aggressive Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1417–1429.

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. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* *319*, 1676–1679.

Lernbecher, T., Müller, U., and Wirth, T. (1993). Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* *365*, 767–770.

Letai, A., Sorcinelli, M.D., Beard, C., and Korsmeyer, S.J. (2004). Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell* *6*, 241–249.

Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E.B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* *13*, 4070–4079.

Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Büscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C., and Verma, I.M. (1999a). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.* *13*, 1322–1328.

Li, Z., Wang, H., Xue, L., Shin, D.-M., Roopenian, D., Xu, W., Qi, C.-F., Sangster, M.Y., Orihuela, C.J., Tuomanen, E., et al. (2009). Eμ-BCL10 mice exhibit constitutive activation of both canonical and noncanonical NF-κB pathways generating marginal zone (MZ) B-cell expansion as a precursor to splenic MZ lymphoma. *Blood* *114*, 4158.

Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999b). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* *189*, 1839–1845.

Li, Z.-W., Omori, S.A., Labuda, T., Karin, M., and Rickert, R.C. (2003). IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4630–4637.



- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* *279*, 26243–26250.
- Lieberson, R., Ong, J., Shi, X., and Eckhardt, L.A. (1995). Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. *EMBO J.* *14*, 6229–6238.
- Limon, J.J., and Fruman, D.A. (2010). B Cell Receptor Signaling: Picky About PI3Ks. *Sci Signal* *3*, pe25-pe25.
- Lin, X., and Wang, D. (2004). The roles of CARMA1, Bcl10, and MALT1 in antigen receptor signaling. *Semin. Immunol.* *16*, 429–435.
- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* *276*, 596–599.
- Lin, Y., Gustafson, M.P., Bulur, P.A., Gastineau, D.A., Witzig, T.E., and Dietz, A.B. (2011). Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* *117*, 872–881.
- Linden, M., Kirchhof, N., Carlson, C., and Van Ness, B. (2004). Targeted overexpression of Bcl-XL in B-lymphoid cells results in lymphoproliferative disease and plasma cell malignancies. *Blood* *103*, 2779–2786.
- Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D.V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3792–3797.
- Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W.E., Zinn, K.R., and Zhang, H.-G. (2007). Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* *109*, 4336–4342.
- Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Rospigliosi, C.C., Conze, D.B., Wu, C.-J., Ashwell, J.D., Eliezer, D., and Wu, H. (2009). Structural Basis for Recognition of Diubiquitins by NEMO. *Mol. Cell* *33*, 602–615.
- Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Maiolo, A.T., and Neri, A. (1995). Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic Acids Res.* *23*, 2328–2336.
- Love, C., Sun, Z., Jima, D., Li, G., Zhang, J., Miles, R., Richards, K.L., Dunphy, C.H., Choi, W.W.L., Srivastava, G., et al. (2012). The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat. Genet.* *44*, 1321–1325.
- Lucas, P.C., Kuffa, P., Gu, S., Kohrt, D., Kim, D.S.L., Siu, K., Jin, X., Swenson, J., and McAllister-Lucas, L.M. (2007). A dual role for the API2 moiety in API2-MALT1-dependent NF-kappaB activation: heterotypic oligomerization and TRAF2 recruitment. *Oncogene* *26*, 5643–5654.
- Luo, Q., Li, J., Cencki, B., and Kretzner, L. (2004). Autorepression of c-myc requires both initiator and E2F-binding site elements and cooperation with the p107 gene product. *Oncogene* *23*, 1088–1097.



Luque, I., and Gélinas, C. (1997). Rel/NF- κ B and I κ B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* *8*, 103–111.

Ma, H., Yankee, T.M., Hu, J., Asai, D.J., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2001). Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 1507–1516.

Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* *385*, 540–544.

Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovskiy, A., Pasqualucci, L., et al. (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* *18*, 568–579.

Mansoor, A., Medeiros, L.J., Weber, D.M., Alexanian, R., Hayes, K., Jones, D., Lai, R., Glassman, A., and Bueso-Ramos, C.E. (2001). Cytogenetic Findings in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia Chromosomal Abnormalities Are Associated With the Polymorphous Subtype and an Aggressive Clinical Course. *Am. J. Clin. Pathol.* *116*, 543–549.

Mansouri, L., Sutton, L.-A., Ljungström, V., Bondza, S., Arngården, L., Bhoi, S., Larsson, J., Cortese, D., Kalushkova, A., Plevova, K., et al. (2015). Functional loss of I κ B ϵ leads to NF- κ B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* *212*, 833–843.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 519–531.

Mao, Y., Lu, M.P., Lin, H., Zhang, D.W., Liu, Y., Li, Q.D., Lv, Z.G., Xu, J.R., Chen, R.J., and Zhu, J. (2013). Prognostic significance of EBV latent membrane protein 1 expression in lymphomas: evidence from 15 studies. *PLoS One* *8*, e60313.

Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., et al. (2000). Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* *95*, 1443–1450.

Marchesi, F., Cirillo, M., Bianchi, A., Gately, M., Olimpieri, O.M., Cerchiara, E., Renzi, D., Micera, A., Balzamino, B.O., Bonini, S., et al. (2015). High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* *33*, 110–112.



Marin, M.C., Hsu, B., Stephens, L.C., Brisbay, S., and McDonnell, T.J. (1995). The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp. Cell Res.* *217*, 240–247.

Marinkovic, D., Marinkovic, T., Mahr, B., Hess, J., and Wirth, T. (2004). Reversible lymphomagenesis in conditionally c-MYC expressing mice. *Int. J. Cancer* *110*, 336–342.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* *6*, 13.

Martín-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., et al. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *99*, 1474–1477.

Martin-Subero, J.I., Wlodarska, I., Bastard, C., Picquenot, J.-M., Höppner, J., Giefing, M., Klapper, W., and Siebert, R. (2006). Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood* *108*, 401-402; author reply 402-403.

Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., and Fässler, R. (2006). Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* *125*, 665–677.

Mathas, S., Jöhrens, K., Joos, S., Lietz, A., Hummel, F., Janz, M., Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Lichter, P., et al. (2005). Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* *106*, 4287–4293.

Mathis, B.J., Lai, Y., Qu, C., Janicki, J.S., and Cui, T. (2015). CYLD-mediated signaling and diseases. *Curr. Drug Targets* *16*, 284–294.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.

Mauri, C., and Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* *27*, 479–486.

May, M.J., and Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* *8*, 63–73.

May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glöckner, J., Pober, J.S., and Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I kappa B kinase complex. *Science* *289*, 1550–1554.

Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. (2000). The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1470*, M55-62.

Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., and Segal, D.M. (2002). Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* *168*, 689–695.



Mémet, S., Laouini, D., Epinat, J.C., Whiteside, S.T., Goudeau, B., Philpott, D., Kayal, S., Sansonetti, P.J., Berche, P., Kanellopoulos, J., et al. (1999). IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 5994–6005.

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.

Meyer, P.N., Fu, K., Greiner, T., Smith, L., Delabie, J., Gascoyne, R., Ott, G., Rosenwald, A., Braziel, R., Campo, E., et al. (2011). The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Am. J. Clin. Pathol.* *135*, 54–61.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* *5*, 503–507.

Migliazza, A., Lombardi, L., Rocchi, M., Trecca, D., Chang, C.C., Antonacci, R., Fracchiolla, N.S., Ciana, P., Maiolo, A.T., and Neri, A. (1994). Heterogeneous chromosomal aberrations generate 3' truncations of the NFKB2/lyt-10 gene in lymphoid malignancies. *Blood* *84*, 3850–3860.

Mishalian, I., Bayuh, R., Levy, L., Zolotarov, L., Michaeli, J., and Fridlender, Z.G. (2013). Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *62*, 1745–1756.

Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* *60*, 6318–6325.

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 Lond. Engl.* *379*, 1234–1244.

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.

Moore, C.R., Liu, Y., Shao, C., Covey, L.R., Morse, H.C., and Xie, P. (2012). Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice. *Leukemia* *26*, 1122–1127.

Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2002). What is a natural killer cell? *Nat. Immunol.* *3*, 6–8.



Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa, S.S., Hartge, P., Weisenburger, D.D., and Linet, M.S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107, 265–276.

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.

Muzio, M., Scielzo, C., Bertilaccio, M.T.S., Frenquelli, M., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2009). Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 144, 507–516.

Nagel, D., Vincendeau, M., Eitelhuber, A.C., and Krappmann, D. (2014). Mechanisms and consequences of constitutive NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Oncogene* 33, 5655–5665.

Nam, S.J., Go, H., Paik, J.H., Kim, T.M., Heo, D.S., Kim, C.W., and Jeon, Y.K. (2014). An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk. Lymphoma* 55, 2466–2476.

Naylor, T.L., Tang, H., Ratsch, B.A., Enns, A., Loo, A., Chen, L., Lenz, P., Waters, N.J., Schuler, W., Dörken, B., et al. (2011). Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res.* 71, 2643–2653.

Neri, A., Chang, C.-C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A.T., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50. *Cell* 67, 1075–1087.

Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., et al. (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134, 668–678.

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.

Nguyen-Khac, F., Lambert, J., Chapiro, E., Grelier, A., Mould, S., Barin, C., Daudignon, A., Gachard, N., Struski, S., Henry, C., et al. (2013). Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 98, 649–654.

Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, 9007–9021.

Ning, S. (2011). Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae* 2, 1.



Nissinen, L., Farshchian, M., Riihilä, P., and Kähäri, V.-M. (2016). New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Tissue Res.* 365, 691–702.

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.

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.

Nonaka, M., Horie, R., Itoh, K., Watanabe, T., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2005). Aberrant NF-kappaB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts. *Oncogene* 24, 3976–3986.

Novak, U., Rinaldi, A., Kwee, I., Nandula, S.V., Rancoita, P.M.V., Compagno, M., Cerri, M., Rossi, D., Murty, V.V., Zucca, E., et al. (2009). The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* 113, 4918–4921.

Nowakowski, G.S., and Czuczman, M.S. (2015). ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* e449-457.

Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000034.

Ogasawara, T., Yasuyama, M., and Kawauchi, K. (2003). Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in B-cell lymphoproliferative disorders. *Int. J. Hematol.* 77, 364–370.

Ohno, H., Takimoto, G., and McKeithan, T.W. (1990). The candidate proto-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 60, 991–997.

Ohtsuki, T., Nishitani, K., Hatamochi, A., Yawata, Y., and Namba, M. (1991). Analysis of methylation in the *c-MYC* gene in five human myeloma cell lines. *Br. J. Haematol.* 77, 172–179.

Ok, C.Y., Papathomas, T.G., Medeiros, L.J., and Young, K.H. (2013). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood* 122, 328–340.

Ong, S.T., Hackbarth, M.L., Degenstein, L.C., Baunoch, D.A., Anastasi, J., and McKeithan, T.W. (1998). Lymphadenopathy, splenomegaly, and altered immunoglobulin production in *BCL3* transgenic mice. *Oncogene* 16, 2333–2343.



Opipari, A.W., 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.

Ott, G. (2014). Impact of MYC on malignant behavior. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2014*, 100–106.

Ott, G., Katzenberger, T., Greiner, A., Kalla, J., Rosenwald, A., Heinrich, U., Ott, M.M., and Müller-Hermelink, H.K. (1997). The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res.* *57*, 3944–3948.

Ott, G., Rosenwald, A., and Campo, E. (2013). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood* *122*, 3884–3891.

Otto, C., Giefing, M., Massow, A., Vater, I., Gesk, S., Schlesner, M., Richter, J., Klapper, W., Hansmann, M.-L., Siebert, R., et al. (2012). Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* *157*, 702–708.

Oyama, T., Ichimura, K., Suzuki, R., Suzumiya, J., Ohshima, K., Yatabe, Y., Yokoi, T., Kojima, M., Kamiya, Y., Taji, H., et al. (2003). Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* *27*, 16–26.

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 c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int. J. Cancer* *87*, 787–793.

Palomo, C., Zou, X., Nicholson, I.C., Bützler, C., and Brüggemann, M. (1999). B-cell tumorigenesis in mice carrying a yeast artificial chromosome-based immunoglobulin heavy/c-myc translocus is independent of the heavy chain intron enhancer (Emu). *Cancer Res.* *59*, 5625–5628.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* *39*, 38–48.

Pang, M.-F., Lin, K.-W., and Peh, S.-C. (2009). The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *14*, 222–247.

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

Pasparakis, M., Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2002). I κ B kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J. Exp. Med.* *196*, 743–752.

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., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* *43*, 830–837.

Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.-J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., et al. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 10826–10834.

Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 764–776.

Pelicci, P.G., Knowles, D.M., Magrath, I., and Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 2984–2988.

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.

Piva, R., Gianferretti, P., Ciucci, A., Tauli, R., Belardo, G., and Santoro, M.G. (2005). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* *105*, 1750–1758.

Plaksin, D., Baeuerle, P.A., and Eisenbach, L. (1993). KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1651–1662.

Pohl, T., Gugasyan, R., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Tarlinton, D., Sha, W., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (2002). The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4514–4519.

Polack, A., Feederle, R., Klobeck, G., and Hörtnagel, K. (1993). Regulatory elements in the immunoglobulin kappa locus induce c-myc activation and the promoter shift in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* *12*, 3913–3920.

Poljak, L., Carlson, L., Cunningham, K., Kosco-Vilbois, M.H., and Siebenlist, U. (1999). Distinct Activities of p52/NF-κB Required for Proper Secondary Lymphoid Organ Microarchitecture: Functions Enhanced by Bcl-3. *J. Immunol.* *163*, 6581–6588.

Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 71–78.



Pope, J.H., Horne, M.K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer* *3*, 857–866.

Prendes, M., Zheng, Y., and Beg, A.A. (2003). Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF-kappa B complexes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *171*, 3963–3969.

Puente, X.S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G.R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., et al. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* *475*, 101–105.

Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K., and Johnson, D.G. (2006). ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1446–1451.

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* *141*, 39–51.

Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat. Med.* *4*, 627–630.

Rabbitts, T.H., Forster, A., Hamlyn, P., and Baer, R. (1984). Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma. *Nature* *309*, 592–597.

Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., et al. (2009). Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* *136*, 1098–1109.

Rahman, H.A.A., Khorshied, M.M., Khorshid, O.M.R., and Mahgoub, S.M. (2014). Toll-like receptor 2 and 9 genetic polymorphisms and the susceptibility to B cell Non-Hodgkin Lymphoma in Egypt. *Ann. Hematol.* *93*, 1859–1865.

Ramakrishnan, P., Wang, W., and Wallach, D. (2004). Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* *21*, 477–489.

Ramsay, A.G., Johnson, A.J., Lee, A.M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J.C., and Gribben, J.G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J. Clin. Invest.* *118*, 2427–2437.

Ramsay, A.G., Clear, A.J., Kelly, G., Fatah, R., Matthews, J., MacDougall, F., Lister, T.A., Lee, A.M., Calaminici, M., and Gribben, J.G. (2009). Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* *114*, 4713–4720.

Ramsay, A.G., Clear, A.J., Fatah, R., and Gribben, J.G. (2012). Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be



blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* *120*, 1412–1421.

Ranuncolo, S.M., Pittaluga, S., Evbuomwan, M.O., Jaffe, E.S., and Lewis, B.A. (2012). Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. *Blood* *120*, 3756–3763.

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.

Rath, P.C., and Aggarwal, B.B. (2001). Antiproliferative effects of IFN- α correlate with the downregulation of nuclear factor- κ B in human Burkitt lymphoma Daudi cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *21*, 523–528.

Raulet, D.H. (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* *5*, 996–1002.

Ren, H., Schmalstieg, A., Yuan, D., and Gaynor, R.B. (2002). I- κ B kinase beta is critical for B cell proliferation and antibody response. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *168*, 577–587.

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 c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8541–8555.

Richter, J., Schlesner, M., Hoffmann, S., Kreuz, M., Leich, E., Burkhardt, B., Rosolowski, M., Ammerpohl, O., Wagener, R., Bernhart, S.H., et al. (2012). Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat. Genet.* *44*, 1316–1320.

Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* *25*, 1317–1318.

Riemersma, S.A., Jordanova, E.S., Schop, R.F., Philippo, K., Looijenga, L.H., Schuurin, E., and Kluin, P.M. (2000). Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. *Blood* *96*, 3569–3577.

Rimsza, L.M., Roberts, R.A., Miller, T.P., Unger, J.M., LeBlanc, M., Brazier, R.M., Weisenberger, D.D., Chan, W.C., Muller-Hermelink, H.K., Jaffe, E.S., et al. (2004). Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* *103*, 4251–4258.

Ritorto, M.S., Ewan, R., Perez-Oliva, A.B., Knebel, A., Buhrlage, S.J., Wightman, M., Kelly, S.M., Wood, N.T., Virdee, S., Gray, N.S., et al. (2014). Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Commun.* *5*, 4763.



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 c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028–1038.

Roda, J.M., Parihar, R., and Carson, W.E. (2005). CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 1619–1627.

Romano, M.F., Lamberti, A., Tassone, P., Alfinito, F., Costantini, S., Chiurazzi, F., Defrance, T., Bonelli, P., Tuccillo, F., Turco, M.C., et al. (1998). Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 92, 990–995.

Rosebeck, S., Madden, L., Jin, X., Gu, S., Apel, I.J., Appert, A., Hamoudi, R.A., Noels, H., Sagaert, X., Van Loo, P., et al. (2011). Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science* 331, 468–472.

Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., et al. (2003). Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. *J. Exp. Med.* 198, 851–862.

Rosenwald, I.B., Rhoads, D.B., Callanan, L.D., Isselbacher, K.J., and Schmidt, E.V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6175–6178.

Rose-Zerilli, M.J.J., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Rodríguez, A.E., Chaplin, T., Gardiner, A., Steele, A.J., Collins, A., Young, B.D., et al. (2014). ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* 99, 736–742.

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.

Rotondo, R., Barisione, G., Mastracci, L., Grossi, F., Orengo, A.M., Costa, R., Truini, M., Fabbi, M., Ferrini, S., and Barbieri, O. (2009). IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 125, 887–893.

Rouaud, P., Fiancette, R., Vincent-Fabert, C., Magnone, V., Cogné, M., Dubus, P., and Denizot, Y. (2012). Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* 3, 586–593.

Ryan, K.M., and Birnie, G.D. (1996). Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 713–721.

Rydström, K., Linderöth, J., Nyman, H., Ehinger, M., Joost, P., Bendahl, P.-O., Leppä, S., and Jerkeman, M. (2010). CD40 is a potential marker of favorable prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Leuk. Lymphoma* 51, 1643–1648.



Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 674–684.

Sagaert, X., Theys, T., De Wolf-Peeters, C., Marynen, P., and Baens, M. (2006). Splenic marginal zone lymphoma-like features in API2-MALT1 transgenic mice that are exposed to antigenic stimulation. *Haematologica* *91*, 1693–1696.

Saito, K., Kigawa, T., Koshiba, S., Sato, K., Matsuo, Y., Sakamoto, A., Takagi, T., Shirouzu, M., Yabuki, T., Nunokawa, E., et al. (2004). The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKKgamma. *Struct. Lond. Engl.* *1993 12*, 1719–1728.

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.

Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* *101*, 455–458.

Sanchez-Izquierdo, D., Buchonnet, G., Siebert, R., Gascoyne, R.D., Climent, J., Karran, L., Marin, M., Blesa, D., Horsman, D., Rosenwald, A., et al. (2003). MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* *101*, 4539–4546.

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.

Sasaki, Y., Derudder, E., Hobeika, E., Pelanda, R., Reth, M., Rajewsky, K., and Schmidt-Supprian, M. (2006). Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* *24*, 729–739.

Sasaki, Y., Calado, D.P., Derudder, E., Zhang, B., Shimizu, Y., Mackay, F., Nishikawa, S., Rajewsky, K., and Schmidt-Supprian, M. (2008). NIK overexpression amplifies, whereas ablation of its TRAF3-binding domain replaces BAFF:BAFF-R-mediated survival signals in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10883–10888.

Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 4304–4310.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *6*, 1087–1095.



Savage, K.J., Monti, S., Kutok, J.L., Cattoretti, G., Neuberg, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., et al. (2003). The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 3871–3879.

Sawyer, J.R., Waldron, J.A., Jagannath, S., and Barlogie, B. (1995). Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 82, 41–49.

Schattner, E.J. (2000). CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leuk. Lymphoma* 37, 461–472.

Schauer, S.L., Wang, Z., Sonenshein, G.E., and Rothstein, T.L. (1996). Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 81–86.

Schena, M., Larsson, L.G., Gottardi, D., Gaidano, G., Carlsson, M., Nilsson, K., and Caligaris-Cappio, F. (1992). Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 79, 2981–2989.

Schlee, M., Hölzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., et al. (2007). C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int. J. Cancer* 120, 1387–1395.

Schmid, R.M., Perkins, N.D., Duckett, C.S., Andrews, P.C., and Nabel, G.J. (1991). Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature* 352, 733–736.

Schmidt, A., Schmitz, R., Giefing, M., Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Vater, I., Massow, A., Maggio, E., Schneider, M., Hansmann, M.-L., et al. (2010). Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 49, 803–809.

Schmidt, J., Federmann, B., Schindler, N., Steinhilber, J., Bonzheim, I., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2015). MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br. J. Haematol.* 169, 795–803.

Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hülsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U., and Scheidereit, C. (2001). Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3843–3853.

Schmitt, C.A., McCurrach, M.E., de Stanchina, E., Wallace-Brodeur, R.R., and Lowe, S.W. (1999). INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev.* 13, 2670–2677.

Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.-L., and Küppers, R. (2009a). Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 151–174.



Schmitz, R., Hansmann, M.-L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., et al. (2009b). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* *206*, 981–989.

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.

Schop, R.F.J., Wier, S.A.V., Xu, R., Ghobrial, I., Ahmann, G.J., Greipp, P.R., Kyle, R.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Rajkumar, S.V., et al. (2006). 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet. Cytogenet.* *169*, 150–153.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* *331*, 1565–1570.

Schwarz, E.M., Krimpenfort, P., Berns, A., and Verma, I.M. (1997). Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev.* *11*, 187–197.

Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.-L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* *101*, 1505–1512.

Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5227–5235.

Seda, V., and Mraz, M. (2015). B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur. J. Haematol.* *94*, 193–205.

Seitz, V., Butzhammer, P., Hirsch, B., Hecht, J., Gütgemann, I., Ehlers, A., Lenze, D., Oker, E., Sommerfeld, A., von der Wall, E., et al. (2011). Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One* *6*, e26837.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705–716.

Senftleben, U., Li, Z.W., Baud, V., and Karin, M. (2001). IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* *14*, 217–230.

Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321–330.

Shain, K.H., Dalton, W.S., and Tao, J. (2015). The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies. *Oncogene* *34*, 4673–4682.



Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370.

Shi, Y., Glynn, J.M., Guilbert, L.J., Cotter, T.G., Bissonnette, R.P., and Green, D.R. (1992). Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257, 212–214.

Shimoyama, Y., Yamamoto, K., Asano, N., Oyama, T., Kinoshita, T., and Nakamura, S. (2008). Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. *Cancer Sci.* 99, 1085–1091.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.

Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P., and Magrath, I. (1991). Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 77, 1516–1526.

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.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.

Silverman, N., and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15, 2321–2342.

Sinha, P., Clements, V.K., and Ostrand-Rosenberg, S. (2005). Reduction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Induction of M1 Macrophages Facilitate the Rejection of Established Metastatic Disease. *J. Immunol.* 174, 636–645.

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.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 850–861.

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.

Soysal, S.D., Tzankov, A., and Muenst, S.E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 82, 142–152.



Stasik, C.J., Nitta, H., Zhang, W., Mosher, C.H., Cook, J.R., Tubbs, R.R., Unger, J.M., Brooks, T.A., Persky, D.O., Wilkinson, S.T., et al. (2010). Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 95, 597–603.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189–218.

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.

Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271–296.

Stephens, R.M., Rice, N.R., Hiebsch, R.R., Bose, H.R., and Gildea, R.V. (1983). Nucleotide sequence of v-rel: the oncogene of reticuloendotheliosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6229–6233.

van de Stolpe, A., and van der Saag, P.T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 74, 13–33.

Stopeck, A.T., Gessner, A., Miller, T.P., Hersh, E.M., Johnson, C.S., Cui, H., Frutiger, Y., and Grogan, T.M. (2000). Loss of B7.2 (CD86) and intracellular adhesion molecule 1 (CD54) expression is associated with decreased tumor-infiltrating T lymphocytes in diffuse B-cell large-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 3904–3909.

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 bcl-2. *Nature* 348, 331–333.

Streubel, B., Lamprecht, A., Dierlamm, J., Cerroni, L., Stolte, M., Ott, G., Raderer, M., and Chott, A. (2003). T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101, 2335–2339.

Strobl, L.J., and Eick, D. (1992). Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *EMBO J.* 11, 3307–3314.

Strobl, L.J., Kohlhuber, F., Mautner, J., Polack, A., and Eick, D. (1993). Absence of a paused transcription complex from the c-myc P2 promoter of the translocation chromosome in Burkitt's lymphoma cells: implication for the c-myc P1/P2 promoter shift. *Oncogene* 8, 1437–1447.

Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912–1915.

Suzuki, K., Suda, T., Naito, T., Ide, K., Chida, K., and Nakamura, H. (2005). Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 707–713.



Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* *127*, 2375–2390.

Swierczak, A., Mouchemore, K.A., Hamilton, J.A., and Anderson, R.L. (2015). Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *34*, 735–751.

Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 739–752.

Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L., and Goeddel, D.V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* *10*, 421–429.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7837–7841.

Tazzyman, S., Barry, S.T., Ashton, S., Wood, P., Blakey, D., Lewis, C.E., and Murdoch, C. (2011). Inhibition of neutrophil infiltration into A549 lung tumors in vitro and in vivo using a CXCR2-specific antagonist is associated with reduced tumor growth. *Int. J. Cancer* *129*, 847–858.

Ten, R.M., Paya, C.V., Israël, N., Le Bail, O., Mattei, M.G., Virelizier, J.L., Kourilsky, P., and Israël, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. *EMBO J.* *11*, 195–203.

Terré, C., Nguyen-Khac, F., Barin, C., Mozziconacci, M.J., Eclache, V., Léonard, C., Chapiro, E., Farhat, H., Bouyon, A., Rousselot, P., et al. (2006). Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenström's macroglobulinemia: a study of 39 cases. *Leukemia* *20*, 1634–1636.

Tewari, M., Wolf, F.W., Seldin, M.F., O'Shea, K.S., Dixit, V.M., and Turka, L.A. (1995). Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. *J. Immunol. Baltim. Md* *154*, 1699–1706.

Thome, M., Charton, J.E., Pelzer, C., and Hailfinger, S. (2010). Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003004.

Thorley-Lawson, D.A., and Allday, M.J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 913–924.

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.

Thornburg, N.J., Kulwichit, W., Edwards, R.H., Shair, K.H.Y., Bendt, K.M., and Raab-Traub, N. (2006). LMP1 signaling and activation of NF-kappaB in LMP1 transgenic mice. *Oncogene* *25*, 288–297.



- Tian, B., Nowak, D.E., Jamaluddin, M., Wang, S., and Brasier, A.R. (2005). Identification of direct genomic targets downstream of the nuclear factor-kappaB transcription factor mediating tumor necrosis factor signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 17435–17448.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 1081–1089.
- 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 Lond. Engl.* *361*, 217–223.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschirritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* *424*, 793–796.
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogné, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogné, M., and Denizot, Y. (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 6033–6042.
- Tsao, L., and Hsi, E.D. (2007). The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *131*, 1209–1218.
- Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Sasaki, Y., Takahama, M., and Konishi, Y. (1999). Hypomethylation of CpG sites and c-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. Gann* *90*, 909–913.
- Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., et al. (1998). BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res.* *58*, 256–262.
- Tumang, J.R., Owyang, A., Andjelic, S., Jin, Z., Hardy, R.R., Liou, M.L., and Liou, H.C. (1998). c-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression. *Eur. J. Immunol.* *28*, 4299–4312.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 1158–1165.
- Ueda, C., Nishikori, M., Kitawaki, T., Uchiyama, T., and Ohno, H. (2004). Coexistent rearrangements of c-MYC, BCL2, and BCL6 genes in a diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* *79*, 52–54.
- Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* *2015*, 983698.



Valera, A., López-Guillermo, A., Cardesa-Salzmann, 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.

Vallejo, A.N., Davila, E., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2004). Biology of T lymphocytes. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *30*, 135–157.

Varano, G., Raffel, S., Sormani, M., Zanardi, F., Lonardi, S., Zasada, C., Perucho, L., Petrocelli, V., Haake, A., Lee, A.K., et al. (2017). The B-cell receptor controls fitness of MYC-driven lymphoma cells via GSK3 β inhibition. *Nature* *546*, 302–306.

Vega, G.G., Avilés-Salas, A., Chalapud, J.R., Martínez-Paniagua, M., Pelayo, R., Mayani, H., Hernández-Pando, R., Martínez-Maza, O., Huerta-Yepez, S., Bonavida, B., et al. (2015). P38 MAPK expression and activation predicts failure of response to CHOP in patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *BMC Cancer* *15*.

Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J.M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J. Virol.* *42*, 773–779.

Vereecke, L., Beyaert, R., and van Loo, G. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol.* *30*, 383–391.

Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., Dikic, I., and Beyaert, R. (2012). A20 inhibits LUBAC-mediated NF- κ B 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.

Victoria, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* *120*, 2240–2248.

Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Rouaud, P., Baudet, C., Truffinet, V., Magnone, V., Guillaudeau, A., Cogné, M., Dubus, P., and Denizot, Y. (2012). A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am. J. Pathol.* *180*, 1688–1701.

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

Vockerodt, M., Morgan, S.L., Kuo, M., Wei, W., Chukwuma, M.B., Arrand, J.R., Kube, D., Gordon, J., Young, L.S., Woodman, C.B., et al. (2008). The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J. Pathol.* *216*, 83–92.



Vockerodt, M., Wei, W., Nagy, E., Prouzova, Z., Schrader, A., Kube, D., Rowe, M., Woodman, C.B., and Murray, P.G. (2013). Suppression of the LMP2A target gene, EGR-1, protects Hodgkin's lymphoma cells from entry to the EBV lytic cycle. *J. Pathol.* *230*, 399–409.

Vogt, P.K., Hart, J.R., Gymnopoulos, M., Jiang, H., Kang, S., Bader, A.G., Zhao, L., and Denley, A. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 79–104.

Vrzalikova, K., Vockerodt, M., Leonard, S., Bell, A., Wei, W., Schrader, A., Wright, K.L., Kube, D., Rowe, M., Woodman, C.B., et al. (2011). Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. *Blood* *117*, 5907–5917.

Wada, N., Zaki, M.A.A., Hori, Y., Hashimoto, K., Tsukaguchi, M., Tatsumi, Y., Ishikawa, J., Tominaga, N., Sakoda, H., Take, H., et al. (2012). Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* *60*, 313–319.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Brioli, A., Boyle, E., Kaiser, M.F., Begum, D.B., Dahir, N.B., Johnson, D.C., Ross, F.M., Davies, F.E., et al. (2014). Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J.* *4*, e191.

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, J.Q., Jeelall, Y.S., Beutler, B., Horikawa, K., and Goodnow, C.C. (2014a). Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. *J. Exp. Med.* *211*, 413–426.

Wang, J.Q., Jeelall, Y.S., Ferguson, L.L., and Horikawa, K. (2014b). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front. Immunol.* *5*, 367.

Wang, L.W., Jiang, S., and Gewurz, B.E. (2017). Epstein-Barr Virus LMP1 Mediated Oncogenicity. *J. Virol.*

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.

Wegener, E., and Krappmann, D. (2007). CARD-Bcl10-Malt1 signalosomes: missing link to NF-kappaB. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2007*, pe21.

Wegener, E., Oeckinghaus, A., Papadopoulou, N., Lavitas, L., Schmidt-Supprian, M., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Heissmeyer, V., and Krappmann, D. (2006). Essential role for IkkappaB kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. *Mol. Cell* *23*, 13–23.



Weh, H.J., Gutensohn, K., Selbach, J., Kruse, R., Wacker-Backhaus, G., Seeger, D., Fiedler, W., Fett, W., and Hossfeld, D.K. (1993). Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 29A, 1269–1273.

Weih, D.S., Yilmaz, Z.B., and Weih, F. (2001). Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 1909–1919.

Weil, R., Whiteside, S.T., and Israël, A. (1997). Control of NF-kappa B activity by the I kappa B beta inhibitor. *Immunobiology* 198, 14–23.

Weiner, G.J. (2009). CpG oligodeoxynucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 263–267.

Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S., and Kuehl, W.M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 113, 5418–5422.

Welcker, M., and Clurman, B.E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat. Rev. Cancer* 8, 83–93.

Wertz, I.E., and Dixit, V.M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003350.

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 c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv. Cancer Res.* 99, 113–333.

Wilkinson, S.T., Vanpatten, K.A., Fernandez, D.R., Brunhoeber, P., Garsha, K.E., Glinsmann-Gibson, B.J., Grogan, T.M., Teruya-Feldstein, J., and Rimsza, L.M. (2012). Partial plasma cell differentiation as a mechanism of lost major histocompatibility complex class II expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 119, 1459–1467.

Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., et al. (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35–45.

Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1997). IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278, 866–869.

Wu, L., Nakano, H., and Wu, Z. (2006). The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J. Biol. Chem.* 281, 2162–2169.



Wu, S.-D., Ma, Y.-S., Fang, Y., Liu, L.-L., Fu, D., and Shen, X.-Z. (2012). Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 218–225.

Wulf, G.M., Liou, Y.-C., Ryo, A., Lee, S.W., and Lu, K.P. (2002). Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *277*, 47976–47979.

Xie, P., Hostager, B.S., and Bishop, G.A. (2004). Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* *199*, 661–671.

Xie, P., Stunz, L.L., Larison, K.D., Yang, B., and Bishop, G.A. (2007). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity* *27*, 253–267.

Xu, L., Hunter, Z.R., Tsakmaklis, N., Cao, Y., Yang, G., Chen, J., Liu, X., Kanan, S., Castillo, J.J., Tai, Y.-T., et al. (2016). Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* *172*, 735–744.

Xu, Y., Jiang, L., Fang, J., Fang, R., Morse, H.C., Ouyang, G., and Zhou, J.X. (2015). Loss of IRF8 Inhibits the Growth of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *J. Cancer* *6*, 953–961.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* *301*, 640–643.

Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., et al. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature* *430*, 218–222.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israël, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* *93*, 1231–1240.

Yan, C., Wang, H., Aggarwal, B., and Boyd, D.D. (2004). A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF- κ B motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 540–541.

Yan, J., Nie, K., Mathew, S., Tam, Y., Cheng, S., Knowles, D.M., Orazi, A., and Tam, W. (2014). Inactivation of BANK1 in a novel IGH-associated translocation t(4;14)(q24;q32) suggests a tumor suppressor role in B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* *4*, e215.

Yang, Y., Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., et al. (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* *21*, 723–737.



Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2006). Attenuation of CD8+ T-Cell Function by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res.* *66*, 10145–10152.

Ye, H., Dogan, A., Karran, L., Willis, T.G., Chen, L., Wlodarska, I., Dyer, M.J., Isaacson, P.G., and Du, M.Q. (2000). BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am. J. Pathol.* *157*, 1147–1154.

Ye, H., Liu, H., Attygalle, A., Wotherspoon, A.C., Nicholson, A.G., Charlotte, F., Leblond, V., Speight, P., Goodlad, J., Lavergne-Slove, A., et al. (2003). Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* *102*, 1012–1018.

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 c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* *6*, 308–318.

Yilmaz, Z.B., Weih, D.S., Sivakumar, V., and Weih, F. (2003). RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J.* *22*, 121–130.

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., and Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* *209*, 1201–1217.

Young, L.S., Yap, L.F., and Murray, P.G. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 789–802.

Young, R.M., Shaffer, A.L., Phelan, J.D., and Staudt, L.M. (2015). B cell Receptor Signaling in Diffuse Large B cell Lymphoma. *Semin. Hematol.* *52*, 77–85.

Yu, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J., and Calame, K. (2000). Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2592–2603.

Zanetti, M., Castiglioni, P., Schoenberger, S., and Gerlioni, M. (2003). The role of relB in regulating the adaptive immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *987*, 249–257.

Zauner, L., and Nadal, D. (2012). Understanding TLR9 action in Epstein-Barr virus infection. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *17*, 1219–1231.

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, B., Calado, D.P., Wang, Z., Fröhler, S., Köchert, K., Qian, Y., Korolov, S.B., Schmidt-Supprian, M., Sasaki, Y., Unitt, C., et al. (2015). An Oncogenic Role for Alternative NF- κ B Signaling in DLBCL Revealed upon Deregulated BCL6 Expression. *Cell Rep.* *11*, 715–726.

Zhang, J., Grubor, V., Love, C.L., Banerjee, A., Richards, K.L., Mieczkowski, P.A., Dunphy, C., Choi, W., Au, W.Y., Srivastava, G., et al. (2013a). Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 1398–1403.

Zhang, Q., Lenardo, M.J., and Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* *168*, 37–57.

Zhang, X., Paun, A., Claudio, E., Wang, H., and Siebenlist, U. (2013b). The tumor promoter and NF- κ B modulator Bcl-3 regulates splenic B cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 5984–5992.

Zhao, L., and Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* *27*, 5486–5496.

Zheng, B., Fiumara, P., Li, Y.V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J.N., Carbone, A., and Younes, A. (2003). MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* *102*, 1019–1027.

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.



Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du gène <i>c-myc</i> (modifié d'après (Ryan and Birnie, 1996)).	16
Figure 2 : Activités activatrice et inhibitrice de <i>c-Myc</i> . (modifié à partir de (Klapproth and Wirth, 2010)).	18
Figure 3 : Représentation du mécanisme d'auto-répression du promoteur P2 de <i>c-Myc</i> .	20
Figure 4 : Représentation schématique du gène <i>c-myc</i> (modifié à partir de (Wierstra and Alves, 2008)).	21
Figure 5 : Processus cellulaires contrôlés par <i>c-Myc</i> dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse (Cai et al., 2015).	24
Figure 6 : Les différentes phases du cycle cellulaire sont contrôlées par des complexes protéiques associant une kinase CDK à une sous-unité régulatrice (cycline).	25
Figure 7 : Représentation schématique du contrôle de la progression en G1 et du passage en G1/S par <i>c-Myc</i> .	26
Figure 8 : Interaction de <i>c-Myc</i> avec les voies de signalisation apoptotiques.	27
Figure 9 : Localisation des points de cassure au niveau du gène <i>c-myc</i> et sur le locus <i>IgH</i> lors du lymphome de Burkitt (LB) (modifié à partir de (Blum et al., 2004)).	31
Figure 10 : Représentation schématique du changement de promoteur de P2 vers P1 dans les cellules de lymphomes de Burkitt. (ARN polymérase II : rond bleu).	32
Figure 11 : Représentation schématique de la construction du modèle murin $E\mu$ - <i>myc</i> . (Modifié à partir de (Adams et al., 1985)).	37
Figure 12 : Représentation schématique de la construction du modèle murin $Ig\lambda$ - <i>myc</i> (modifié à partir de (Kovalchuk et al., 2000)).	39
Figure 13 : Représentation schématique de la construction du modèle murin <i>c-myc</i> -3' <i>IgH</i> LCR (modifié à partir de (Truffinet et al., 2007)).	40
Figure 14 : Représentation schématique de la construction du modèle murin <i>IgH/c-myc</i> YAC (modifié à partir de (Bützler et al., 1997)).	41
Figure 15 : Représentation schématique de la construction du modèle murin <i>c-myc</i> . $C\alpha$ / <i>IgH</i> (modifié à partir de (Cheung et al., 2004)).	43
Figure 16 : Représentation schématique de la construction du modèle murin <i>iMyc</i> ($E\mu$) (modifié à partir de (Park et al., 2005)).	44
Figure 17 : Représentation schématique de la construction du modèle murin $V\kappa^*$ <i>Myc</i> (modifié à partir de (Chesi et al., 2008)).	45



Figure 18 : Représentation schématique de la construction du modèle murin μE -tTA/tetO-myc (modifié à partir de (Marinkovic et al., 2004)).	46
Figure 19 : Représentation schématique de la construction du modèle murin Rosa26Stop ^{FL} MYC et Rosa26Stop ^{FL} P110* (modifié à partir de (Sander et al., 2012)).	48
Figure 20 : Les membres de la famille NF- κ B et des protéines I κ B (Krappmann and Vincendeau, 2016).	51
Figure 21 : La voie de signalisation classique de NF- κ B.	54
Figure 22 : Représentation schématique des sous-unités du complexe IKK (I κ B kinase).	55
Figure 23 : Représentation schématique de la voies de signalisation TNFR1 (modifiée à partir de (Wertz and Dixit, 2010)).	57
Figure 24 : La voie de signalisation alternative de NF- κ B.	59
Figure 25 : Les voies d'activation classique et alterne de NF- κ B médiées par LMP1.	60
Figure 26 : Modèle de l'infection persistante des lymphocytes B par l'EBV.	65
Figure 27 : Représentation schématique de la dérégulation du BCR et de MYD88 dans les ABC-DLBCL (Krappmann and Vincendeau, 2016).	72
Figure 28 : Représentation schématique de la voie d'activation classique et alterne de NF- κ B par la protéine de fusion BIRC3-MALT1 dans le lymphome de MALT.	77
Figure 29 : Représentation schématique des modifications des voies d'activation de NF- κ B (modifié à partir de (Nagel et al., 2014)).	81
Figure 30 : Représentation schématique des transgènes bcl3 (Hövelmeyer et al., 2014; Ong et al., 1998).	88
Figure 31 : Représentation schématique du modèle murin IKK2ca (Sasaki et al., 2006).	90
Figure 32 : Représentation schématique des transgènes nik.	91
Figure 33 : Représentation schématique du transgène MYD88 ^{L252P} .	93
Figure 34 : Représentation schématique du modèle murin CARD11L225LI.	94
Figure 35 : Représentation schématique du transgène E μ BCL10.	95
Figure 36 : Représentation schématique du transgène E μ BIRC3/MALT1.	96
Figure 37 : Représentation schématique du modèle murin B-TRAF3 ^{-/-} .	97
Figure 38 : Représentation schématique du modèle murin LMP1/CD40.	99
Figure 39 : Polarisation des macrophages et leurs fonctions.	111
Figure 40 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur l'activation des cellules B in vivo des souris wt et λ c-Myc.	118

Figure 41 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des polynucléaires et des macrophages in vivo des souris wt et λ c-Myc..... 119

Figure 42 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules dendritiques classiques (cDC) et plasmacitoïdes (pDC) in vivo des souris wt et λ c-Myc..... 121

Figure 43 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules T B220⁻/CD3⁺/CD4⁺ et T B220⁻/CD3⁺/CD8⁺ in vivo des souris wt et λ c-Myc. 123

Figure 44 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules T reg CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ in vivo des souris wt et λ c-Myc. 124

Figure 45 : Effet de la stimulation par les ODN-CpG sur les pourcentages des cellules NK CD3⁻/CD49b⁺/NK1.1⁺ et l'activation des NK CD3⁻/CD49b⁺/NK1.1⁺/CD69⁺ in vivo des souris wt et λ c-Myc. 125



Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents modèles murins présentant une dérégulation de la voie NF- κ B.	101
Tableau 2 : Liste des différents anticorps utilisés.	117
Tableau 3 : Résumé des différents résultats obtenus.	126



Les lymphomes B diffus à grandes cellules de type activé : rôle de NF- κ B et de c-Myc.

A l'instar du lymphome de Burkitt (LB) avec la translocation de MYC, les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) par d'autres mécanismes (mutation, amplification, dérégulation du promoteur) sont associés à une dérégulation de c-Myc, facteur de transcription maître de la prolifération. Les DLBCL sont classés en deux sous-groupes: « centre germinatif » (GCB) et « cellule B activée » (ABC) avec activation constitutive de NF- κ B. Cette activation constitutive de NF- κ B peut être le résultat d'altérations génétiques (MYD88, A20, TRAF2 et TRAF5) ou de l'activation du BCR ou CD40. Ces caractéristiques soulèvent la question de la synergie d'action entre NF- κ B et c-Myc dans les ABC-DLBCL. Nous avons analysé l'effet d'une activation continue de c-Myc dans un contexte de sur-activation de NF- κ B par plusieurs inducteurs. Nos résultats montrent que la surexpression de c-Myc dans un contexte d'induction de NF- κ B, *i)* par le programme EBV latence III, apporte un avantage sélectif à ces cellules (expression génique en faveur d'un métabolisme élevé, prolifération intense et protection contre apoptose), *ii)* par le TLR9 (modèle *in vivo* et *in vitro*), augmente la survie et la prolifération des lymphocytes B des souris λ c-Myc (augmentation des cellules B activées, splénomégalie, augmentation de la prolifération des lymphocytes B, modification du microenvironnement tumoral), et *iii)* par CD40, induit une lymphomagenèse B très agressive dans les souris doubles transgéniques CD40/Myc, les tumeurs ont un phénotype proche des ABC-DLBCL. Ces résultats suggèrent que c-Myc est un événement co-transformant dans les lymphomes agressifs avec un phénotype activé par NF- κ B, tel que les ABC-DLBCL.

Mots-clés : NF- κ B, c-Myc, DLBCL, TLR9.

Activated B cell Diffuse Large B cell lymphoma : role of NF- κ B and c-Myc.

Not only Burkitt lymphoma (BL) with the translocation of MYC, but also diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by other mechanisms (mutation, amplification, promoter dysregulation...) are associated with dysregulation of c-Myc, the master transcription factor for proliferation. DLBCL's are classified in two subgroups: "Germinal center B-cell" (GCB) without and "activated B-cell" (ABC) with constitutive NF- κ B activation. This constitutive activation of NF- κ B can be the result of genetic alterations (MYD88, A20, TRAF2, and TRAF5) or the activation of B-cell receptor or CD40. These features raise the question of the synergy of action between NF- κ B and c-Myc in ABC-DLBCL. We analyzed the effect of a continuous activation of c-Myc in a context of over-activation of NF- κ B by several inductors. Our results show that overexpression of c-Myc in the context of induction of NF- κ B, *i)* by EBV latency III program, provides a selective advantage to those cells (gene expression in favor of a high metabolism, intense proliferation and protection against apoptosis), *ii)* by TLR9 (*in vivo* and *in vitro* model) increases the survival and proliferation of B lymphocytes of λ c-Myc mice (increase of activated B cells, splenomegaly, increased B cells proliferation, modification of tumor microenvironment), and *iii)* by CD40, induces a very aggressive B lymphomagenesis in CD40/Myc double transgenic mice, the tumors have a phenotype close to ABC-DLBCL. These results suggest that c-Myc is an NF- κ B co-transforming event in aggressive lymphomas with an activated phenotype by NF- κ B, such as ABC-DLBCL.

Keywords : NF- κ B, c-Myc, DLBCL, TLR9