UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année 2013/2014

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Médecine
Ecole doctorale de Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Manel KLIBI

Le 17 Décembre 2013

Remaniement nucléaire dans les lymphocytes B provoqué par les virus EBV et VIH-1

Directeur de thèse	: Yegor VASSETZKY	DR	Gustave Roussy, Villejuif

Composition du jury :

Président	Karim BENIHOUD	PR	Gustave Roussy, Villejuif
Rapporteur	Kamel BENLAGHA	DR	Hôpital Saint Louis
Rapportrice	Eve DEVINOY	DR	INRA Jouy en Josas
Examinateur	Vincent RIBRAG	DR	Gustave Roussy, Villejuif
Examinatrice	Martine RAPHAEL	PR	Université Paris Sud
Examinatrice	Chrystèle BILHOU-NABERA	DR	Hôpital Saint-Antoine

REMERCIEMENTS

A ma petite et chère fille Sarah qui a amené une brise de bonheur à ma vie.
Tu es toute ma vie

A mon mari, sans lui je n'aurais jamais réussi à arriver à ce stade là.
Merci Sami de m'avoir soutenu

A mes parents, Sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui.
Je vous serai éternellement reconnaissante pour votre soutien, votre confiance et votre fierté. Malgré la distance géographique qui nous sépare ces dernières années,
Vous êtes présents à chaque fois que j'ai besoin de vous. En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration

Je vous dédie ma thèse.
Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie

À ma grande sœur Naouel qui m'a transmis son savoir durant ma thèse
*À mon beau frère Kais pour son soutient mor*al *durant les 4 ans de ma thèse*
A mes neveux Mohamed, Amine et Fares qui me manquent énormément
À ma sœur Jihène ou plutôt ma meilleure amie, pour son amitié et ses conseils
À mon beau frère Kamel qui m'a encouragé tout au long de ce travail
À leur petite fille Inés qui m'a transmis sa joie de vivre
À ma petite sœur future chercheuse Amira
À mon petit frère bien aimé Ahmed

Vous avez contribué tous d'une certaine manière à la réalisation de ce travail.
J'ai la chance de vous avoir tous à mes cotés, je vous aime tant.

Je suis très heureuse d'écrire ces remerciements réservés de coutume à l'aboutissement de grands projets. Le mien fut ma thèse de doctorat. Tout d'abord, je tiens à remercier et exprimer toute ma reconnaissance auprès de mon encadrant le Dr Yegor Vassetzky. Il m'a initié à la recherche dans un domaine qui m'a toujours motivé. Méticuleux et perfectionniste, toujours disponible il m'a prodigué des conseils inestimables, dans tous les domaines, tout au long de ma thèse, son aide précieuse et active m'a permis de dépasser des conditions personnelles pas toujours favorables. Je suis très fière de la formation de chercheuse acquise sous son encadrement.

Je remercie ma co-directrice de thèse, le Dr Chrystèle Bilhou-nabera, qui m'a parrainée au commencement de cette thèse, ses commentaires sur la rédaction de mon manuscrit et les rédactions de mes projets de financements m'ont chaque fois permis de m'orienter dans les bonnes directions. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie le Dr Karim Benihoud pour avoir accepté d'examiner ma thèse et de présider mon jury.

Je remercie mon rapporteur le Dr Kamel Benlagha pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant d'évaluer ma thèse. Je le remercie également pour les commentaires très constructifs qu'il a formulés.

Je remercie ma rapportrice le Dr Eve Devinoy pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant également d'évaluer mon travail, et aussi pour m'avoir donné plus de recul sur certains aspects que j'ai abordés au cours de ma thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement mon examinateur le Dr Vincent RIBRAG pour l'enthousiasme qu'il a manifesté à l'égard de ma thèse, ainsi que pour sa générosité pour les échantillons.

Je remercie mon examinatrice Martine Raphael pour tout l'intérêt qu'elle a porté à l'égard de mon travail, merci Dr Martine pour vos conseils constructifs et fructueux.

Je remercie particulièrement le Dr Joëlle Wiels de m'avoir accueilli dans l'unité, encouragé et aidé à plusieurs égards dans la réalisation de mon doctorat. Un très grand merci à Marc Lipinski, directeur adjoint, qui m'a beaucoup soutenu moralement.

Je souhaite également remercier nos collaborateurs, à commencer par Stéphanie Boury Moné, qui était toujours présente pour nos réunions, je l'a remercie aussi pour ces conseils qui m'ont permis d'avancer dans mon projet. Je remercie également Fréderic Subra d'avoir accepté de me fournir les échantillons (VIH-1) et de produire certains mutants afin d'avancer dans mon travail.

Je remercie aussi Lassad Oussaeif grâce à lui j'ai obtenu certains échantillons qui m'ont été d'un grand interêt.

Un immense merci à la plus gentille des filles Tatyana Tsfasman qui a contribué à la réalisation de ce travail, qui m'a soutenu, aidé elle m'a encadré durant les 2 dernières années de ma thèse, elle était toujours disponible pour moi dés que j'avais besoin d'elle, je te remercie Tatyana de tout mon cœur.

Un grand merci à Andrey Pichuguin qui a galéré avec moi au début pour m'apprendre le FISH, pour sa rigueur scientifique accompagné d'un sourire et son aide permanent. Je te souhaite tout le bonheur possible toi ainsi que ta famille.

Je remercie aussi Djamila Bendabech, que j'ai fais sa connaissance en fin de ma thèse et qui m'a aidé pour la correction de mon manuscrit. Je remercie aussi tous mes amis du l'unité UMR8126, mes chères et adorables copines Yara, Luiza, Carla et Diana qui m'ont aidé directement ou indirectement à la réalisation de ce projet de thèse.

LISTE DES ABREVIATIONS…… ……10

LISTE DES FIGURES……..……..……..….12

LISTE DES TABLEAUX……..……..……..15

RESUME…….…….16

ABSTRACT…….…….....19

INTRODUCTION..... 21

1. Noyau interphasique..... 22

1.1. Architecture du noyau et territoires chromosomiques 23

1.1.1. Historique..... 23

1.2. L'organisation du CT corrèle avec la taille des chromosomes et la densité des gènes..26

1.3. Compartiments nucléaires et régulation de l'expression des gènes 29

a. Enveloppe nucléaire 29

b. Hétérochromatine..... 30

c. Les usines de transcription : localisation à un compartiment actif 31

1.4. Organisation nucléaire et translocations 32

1.4.1. Proximité des gènes, translocations et cancer..... 32

2. Les lymphocytes B..... 34

2.1. Développement des lymphocytes B 35

2.2. Expression des gènes d'Immunoglobulines 36

2.2.1. Maturation des lymphocytes B et remaniement V(D)J 37

2.2.1.1. Remaniement V(D)J codant pour la chaine légère (IGL) 37

2.2.1.2. Remaniement VDJ codant pour la chaine lourde (IGH) 38

2.3. Les mécanismes de la recombinaison et de l'hypermutation somatique 39

2.4. Cassures double brin 43

2.4.1. Cassures doubles brins CDBs et réarrangement V(D)J 44

2.4.2. La réparation des cassures doubles brins et les translocations 45

2.5. Les mécanismes de réparation des cassures doubles brins 46

2.5.1. La recombinaison homologue (RH) 46

2.5.2. Non homologous end joining (NHEJ) 47

3. Les lymphomes « B » 50

3.1. Les lymphomes non hodgkiniens de type B 50

3.1.1. Définition 50

3.2. Le Lymphome de Burkitt (BL) 51

3.2.1. Présentation clinique du Lymphome de Burkitt 52

3.2.2. Histologie et biologie 53

3.2.3. Profil génétique du BL 53

3.2.4. *CMYC* et Lymphome de Burkitt 55

3.2.4.1. Rôle physiologique de *CMYC* 55

3.2.4.2. Fonction de la protéine CMYC 56

3.2.4.3. Dérégulation du gène *CMYC* par les activateurs du locus *IGH* 56

3.3 Virus et Lymphomagenèse 58

3.3.1. Le Virus d'Epstein-Barr (EBV) 59

3.3.1.1. Structure du virus EBV 60

3.3.1.2. Cycle biologique de l'EBV 63

3.3.1.2.1. Les voies de contamination 64

3.3.1.2.2. Les cellules cibles de l'EBV 65

a- Les cellules épithéliales 65

b- Les lymphocytes B 67

c- Les cellules cibles non conventionnelles 68

3.3.1.3. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr 68

3.3.1.3.1. Primo-infection et mononucléose infectieuse 68

3.3.1.3.2. EBV et lymphoprolifération 69

a- Activation polyclonale des lymphocytes B 69

b- Rôle de l'EBV dans les Lymphomes de Burkitt 69

3.3.2. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1) 72

3.3.2.1. La structure du VIH-1 72

3.3.2.2. Génome viral du VIH-1 73

3.3.2.2.1. La protéine Tat du VIH-1 75

a- Structure de la protéine Tat-VIH-1 75
b- Fonction et Mécanismes de la protéine Tat-HIV-1 77

* Action de Tat au sein de la cellule infectée par le VIH-1 77

* Action de Tat dans l'environnement de la cellule infectée par le VIH-1 78

* Protéine Tat et internalisation cellulaire 78

3.3.2.3. Cycle biologique du VIH-1 80

3.3.2.3.1. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1 80

3.3.2.3.2. Cellules cibles du VIH-1 81

3.3.2.4. Rôle du VIH-1 dans la lymphomagenèse B 81

3.3.2.4.1 Activation polyclonale des lymphocytes B et infection par le VIH-1 82

3.3.2.4.2. Rôle de Tat dans la lymphoprolifération 85

a- Tat module l'expression des gènes cellulaires 86
b- Tat induit un déficit de la réparation de l'ADN 87
c- Tat induit un stress oxydatif 87
d- Apoptose induite par Tat suite à la modification de la dynamique des microtubules 87
e- Tat induit le remodelage de la chromatine 88

3.3.2.5. Tat comme cible vaccinale et/ou thérapeutique 89

OBJECTIFS 90

RESULTATS..... 91

1. Analyse de la localisation nucléaire des gènes *CMYC* et I*GH*……...…….….92

1.1. Position des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B normaux……...93

1.1.1. Position radiale différente des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B naïfs……..93

1.2. Colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs..... 94

2. Position des loci *IGH* et *CMYC* après activation des lymphocytes B naïfs par le cocktail anti-CD40, anti-IgM et IL4……..96

2.1. Activation des lymphocytes B naïfs humains par le cocktail d'Osborne……..…96

2.2.Modification de la distance radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B humains activés 97

2.3.L'activation des lymphocytes B naïfs humains induit une colocalisation précoce et ponctuelle des loci *IGH* et *CMYC* 99

2.4. Activation des lymphocytes B in vitro et surexpression du gène *CMYC*……...100

3. Position des loci *IGH* et *CMYC* après infection des lymphocytes B naïfs par l'EBV. 101

3.1.Infection des lymphocytes B par EBV et modification de la distance radiale des loci *IGH* et *CMYC*… 101

3.2. Colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B infectés par EBV..103

3.3. Infection des lymphocytes B par EBV et surexpression du gène *CMYC*……....105

4. Position des loci *IGH* et *CMYC* après incubation des lymphocytes B naïfs avec le VIH-1……..106

4.1.Incubation des lymphocytes B avec le VIH-1 et modification de la localisation radiale des loci *IGH* et *CMYC*..... 106

4.2.Augmentation du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B incubés avec le VIH-1 107

4.3. Activation des lymphocytes B par le VIH-1……...109

4.4. Incubation des lymphocytes B avec le VIH-1 et surexpression du gène *CMYC*….110

5. Position des loci *IGH* et *CMYC* après infection des lymphocytes B naïfs par le surnageant viral VIH-1 déplété de son gp120 111

5.1. Le récepteur gp120 n'intervient pas dans la colocalisation *IGH-CMYC*……..…..112

6. Position des loci *IGH* et *CMYC* après incubation des lymphocytes B naïfs par la protéine Tat…..……..113

6.1.La protéine Tat recombinante seule induit la colocalisation *IGH-CMYC*……113

6.2.La protéine Tat-HIV-1 mutée (Tat-C22) n'induit pas la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* ……..114

6.3.La protéine Tat modifie la localisation radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des cellules B..... 115

6.4. Spécificité de l'action de la protéine Tat sur la délocalisation du gène *CMYC*…..116

6.5. Inhibition du nombre des colocalisations *IGH-CMYC* après déplétion de la protéine Tat du surnageant viral VIH-1 118

6.6. Quantification de la protéine Tat dans le surnageant viral VIH-1 par la technique de Dot Blot……...119

6.7. Le nombre de colocalisation *IGH-CMYC* dépend de la dose de Tat …….…....121

7. Etude des mécanismes impliqués dans la colocalisation des loci *IGH-CMYC* 122

7.1. La protéine Tat n'active pas les lymphocytes B……..122

7.2. La protéine Tat recombinante induit la surexpression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B……..... 123

7.3. La protéine Tat-C22 mutante n'induit pas la surexpression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B..... 124

7.4. La superposition des loci *IGH* et *CMYC* colocalisés avec la machinerie transcriptionnelle dans les lymphocytes B traités avec Tat..... 125

7.5. La protéine Tat modifie la structure de la chromatine dans les noyaux des lymphocytes B.. ……..126

CONCLUSION..... 129

DISCUSSION 134

1- Position nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs 135

2- L'activation des lymphocytes B par le cocktail des cytokines et anticorps induit la réorganisation spatiale des loci *IGH* et *CMYC* 133

3- EBV induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs 135
4- VIH-1 induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs 139

5- La protéine Tat-VIH-1 induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs 141

PERSPECTIVES 146

MATERIELS ET METHODES 150

1. Matériels 151

1.1. Lymphocytes B normaux 151

1.2. Lignée lymphoblastoide EBV 151

1.3. Surnageant viral EBV 152

1.4. Surnageant viral VIH-1 152

1.5. Protéine Tat de VIH-1 153

2. Infection des cellules B par EBV 153

3. Infection des cellules B par VIH-1 153

4. Activation des cellules B par les cytokines 153

5. Incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat recombinante 154

6. Hybridation in situ fluorescente (FISH) sur des lymphocytes B fixés 154

6.1. Principe 154

6.2.Conditionnement des cellules..... 154

6.3. Sondes utilisées……...155

6.4. Technique d'hybridation…….155

6.5. Microscopie confocale……155

6.6. Analyse des images en microscopie confocale (microscope confocal Zeiss)…....156

6.7. Analyses statistiques……158

7. Immunofluorescence..... 159

8. Extractions d'ARN, RT et qPCR..... 159

9. Cytométrie en flux (FACS)..... 159

10. Dot Blot..... 160

11. Immunodépletion de la protéine Tat du surnageant contenant le VIH-1 160

12. Immuno-précipitation de chromatine (CHIP)……..……160

ANNEXES..... 162

ARTICLE1

REVIEW

ARTICLE2 (en préparation)

Congrès et communications……..……165

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 166

LISTE DES ABREVIATIONS

µl	microlitre
µm	micromètre
3D	Trois dimensions
aa	Acides aminés
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
BCR	B cell receptor
BL	Burkitt lymphoma
BlyS	B lymphocytes Stimulation
BrdU	Bromodeoxyuridine
C22	Cystein 22
CDB	Cassure Double Brin
Chr	Chromosome
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMYC	Gène CMYC
CSR	CLASS Switch Recombination
CT	Territoire Chromosomique
EBNA	Antigène nucléaire du virus d'EBV
EBV	Epstein - Barr virus
FISH	Hybridation *in situ* fluorescente
gp	Glycoprotéine
HAT	Acétyltransférases
HDAC	Histone désacétylases
HR	Homologous Recombination
Ig	Immunoglobulines
IGH	Chaines lourdes des Immunoglobulines
IL	Interleukine
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LCL	Lymphoblastoide cell line
LMNH	Lymphome Malin Non Hodgkinien

Nef	negative factor
ng	nanogramme
NHEJ	Non-Homologous End Joining
nm	Nanomètre
qPCR	Transcriptase Reverse PCR quantitative
pg	Pikogramme
RT	Transcriptase Reverse

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique tridimensionnelle de l'organisation d'un noyau de cellule eucaryote……..…23

Figure 2. L'existence de territoires chromosomiques…….....25

Figure 3. Positionnement des chromosomes dans un noyau de fibroblaste humain……..…….26

Figure 4. Expérience de marquage du génome des noyaux des cellules primaire de fibroblaste. …….....28

Figure 5. Corrélation entre la taille et la localisation des chromosomes……..…..28

Figure 6. Schéma représentatif d'une usine à transcription…….....33

Figure 7. Les étapes de la maturation des lymphocytes B……..……36

Figure 8. Réarrangements des chaines légères et lourdes d'immunoglobulines par recombinaisons somatiques des segments V(D)J……...……39

Figure 9. Le locus des chaines lourdes d'immunoglobulines (IGH)……...……39

Figure 10. Recombinaison V(D)J…….....41

Figure 11. Le mécanisme d'hypermutation somatique……...……42

Figure 12. Causes, réponse cellulaire et conséquences des cassures double-brin de l'ADN……..…44

Figure 13. Réparation des cassures double-brin……...…49

Figure 14. Origine cellulaire des hémopathies lymphoïdes de type B…….51

Figure 15. Cytologie d'un lymphome de Burkitt……...……..53

Figure 16. Les réarrangements génétiques dans le lymphome de Burkitt…….……...54

Figure 17. Localisation des points de cassure sur le gène *CMYC* et sur le locus *IGH* lors du lymphome de Burkitt chez l'homme……...……55

Figure 18. Fonctions biologiques contrôlées par *CMYC* dans des conditions normales et durant la lymphomagenèse…….……56

Figure 19. Représentation du virus d'Epstein-Barr……...…..61

Figure 20. Les étapes précoces d'une infection par EBV…… ..……....64

Figure21. Modèle de l'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV…….....66

Figure22. Hypothèses pour expliquer le rôle de l'infection EBV dans la formation des BL…….....71

Figure 23. Structure schématique du VIH-1…….…73

Figure 24. Organisation du génome du VIH-1……...……..73

Figure 25. Organisation de la protéine Tat…….....77

Figure 26. Internalisation de la protéine Tat……....79

Figure 27. Conséquences de l'infestation du VIH sur les lymphocytes B……...84

Figure 28. Positionnement des gènes dans le noyau…….…….…….92

Figure 29. FISH en 3D sur des lymphocytes B normaux…….....93
Figure 30. Distance radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B normaux…….....94
Figure 31. Pourcentage des noyaux présentant ou pas des colocalisations des loci *IGH-CMYC*……..95
Figure 32. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire …….……..…97
Figure 33. Analyse de la répartition radiale des allèles *IGH* et *CMYC*…….....98
Figure 34. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés……...99
Figure 35. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B activés et non activés……..100
Figure 36. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* (en vert) et *CMYC* (en rouge) dans les noyaux des lymphocytes B naïfs non infectés (0h), et les noyaux des lymphocytes B durant une cinétique d'infection par EBV…….....102
Figure 37. Pourcentage des signaux *IGH* et *CMYC* colocalisés……..104
Figure 38. Exemple de FISH en 3D sur un noyau de lymphocyte B infecté par EBV présentant une colocalisation *IGH-CMYC*……..…104
Figure 39. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B infectés par EBV……105
Figure 40. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B naïfs (0h), et les noyaux des lymphocytes B durant une cinétique d'incubation avec le surnageant viral HIV-1……...107
Figure 41. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés……108
Figure 42. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire……...110
Figure 43. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC*…….....111
Figure 44. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés…….……112
Figure 45. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés……..114
Figure 46. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* et *CMYC*……....116
Figure 47. Pourcentage des signaux *IGH* et Beta-Globine colocalisés……...117
Figure 48. Pourcentage des signaux *IGH* et *CMYC* colocalisés…….….119
Figure 49. Quantification de la protéine Tat dans le surnageant viral VIH-1 par Dot Blot…….....120
Figure 50. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés…….…….121
Figure 51. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire……...122
Figure 52. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B naïfs et dans les lymphocytes B incubés avec la protéine recombinante Tat……..123
Figure 53. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de *CMYC* en fonction de GAPDH dans les lymphocytes B naïfs et dans les lymphocytes B incubés avec la protéine Tat mutante en C22….124
Figure54. La forme active de l'ARN polymérase II est présente où les gènes *IGH* et *CMYC* colocalisent……...125

Figure 55. Analyse de la structure de la chromatine avant et après incubation des lymphocytes B naïfs avec la protéine Tat recombinante……127
Figure 56. Résultats de ChIP-on-chip du chromosome 8 dans les lymphocytes B……....128
Figure57. cMyc et IgH peuvent être localisés dans la même unité de transcription lorsqu'ils sont exprimés……...….137
Figure 58. Modèle de la réorganisation spatiale des gènes *IGH* et *CMYC*…….…..…...145
Figure 59. Débruitage des images par le logiciel……....…….157
Figure 60. La segmentation nucléaire……..157
Figure 61. Carte de distance : Mesure de la position des gènes dans le noyau……...158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau1. Translocations chromosomiques dérégulant CMYC chez trois espèces de mammifères……58

Tableau 2. Les gènes nucléaires codés par l'EBV…….63

Tableau 3. Fonctions des protéines de régulation du VIH-1……75

RESUME

Le lymphome de Burkitt (BL) est une pathologie, qui est due dans 80% des cas à une translocation chromosomique t(8;14) (q24;q32). Cette translocation marque l'événement initial de la transformation maligne d'une cellule B normale, par délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline *IGH* par le mécanisme de réparation de l'ADN non-homologous end joining (NHEJ) durant l'hypermutation somatique (SMH). Il est déjà connu que le degré de la proximité physique entre deux différents loci avant la translocation augmente la probabilité de leurs illégitime jonction (Nikiforova et *al*., 2000). Des travaux de l'équipe de Peter Fraser ont montré que l'activation des lymphocytes B des souris induit l'augmentation de la colocalisation entre Igh/cMyc (Osborne et *al*., 2007), ce qui peut augmenter le risque de translocation entre ces deux gènes. En effet, une contiguïté nucléaire des gènes impliqués, normalement localisés dans des domaines chromosomiques différents, pourrait être un facteur favorisant une recombinaison génique.

Le BL a une association forte avec l'infection par le virus d'Epstein Barr (EBV) en Afrique et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) en Europe. Plusieurs hypothèses impliquent le rôle de ces deux virus dans le déclenchement du BL.

Concernant le rôle de l'EBV, des travaux antérieurs ont mis en évidence les effets de l'infection par ce virus sur la machinerie transcriptionnelle dans laquelle le proto-oncogène *CMYC* est activé par le transactivateur EBNA2 (protéine nucléaire de l'EBV) (Kaiser et *al*., 1999). L'infection chronique par l'EBV induit l'activation permanente des lymphocytes B, ce qui permet d'obtenir ainsi des lignées des lymphocytes B (LCLs) et de les faire pousser en culture (Kieff et *al*., 1990). De plus d'autres résultats plus récents ont montré que l'infection par l'EBV est à l'origine de la modification de l'organisation des territoires chromatiniens des chromosomes 17 et 18 dans les lymphocytes B (Li et *al*., 2010).

En ce qui concerne le rétrovirus VIH-1, sa capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes B naïfs (LBN) via l'interaction gp120 (récepteurs du VIH-1) et CD21 (ou CR2 des lymphocytes B naïfs) (Malaspina et *al*., 2002) augmentant le risque d'une lymphoprolifération. Il a été montré aussi que la protéine Tat-HIV-1 excrétée par les cellules infectées par le VIH-1 peut pénétrer à travers la membrane d'autres types cellulaires (Debaisieux et *al*., 2011). La protéine Tat peut induire l'hyperactivation des lymphocytes B et

peut aussi interagir avec le génome humain induisant la dérégulation des différents gènes y compris le gène *CMYC* (Arthur et *al*., 2001) (Marban et *al*., 2011). Par ailleurs, il a été mis en évidence que Tat est capable de stimuler le stress oxydatif dans les cellules *in vitro* (Penza et *al*., 2008) provoquant des cassures au niveau de l'ADN et par la suite augmentant le risque de translocation. Il a été suggéré que la protéine Tat-HIV-1 peut induire une déficience au niveau de la réparation des cassures double brin qui peut être responsable du développement des cancers associé au VIH-1 (Nunnari et *al*., 2008). Tat peut aussi affecter la disposition de la chromatine ou son remodelage (Verdone et *al*., 2005) induisant une modification de l'organisation nucléaire et par la suite une augmentation du risque de translocation. De plus, il a été montré que 30% des souris Tat-transgéniques sont capables de développer un lymphome de type B (Kundu et *al*., 1999).

Le changement de l'organisation de la chromatine, la dérégulation de l'expression du gène *CMYC* et l'activation prolongée des lymphocytes B induite par l'infection par EBV et par les protéines du VIH-1 peuvent augmenter le risque de survenue d'une translocation *IGH*/*CMYC*, et l'hypothèse du rôle de ce remaniement dans le développement du BL. Les preuves d'un lien entre ces deux virus et les translocations sont indirectes, le mécanisme par lequel ces virus peuvent provoquer la translocation impliquant *CMYC* et *IGH* est à découvrir. Nos résultats ont montré que, dans les LB humains naïfs, la localisation nucléaire du locus *CMYC* est péricentrale alors que celle du locus *IGH* est plutôt centrale avec seulement 4,7% de colocalisation *IGH-CMYC*. La proximité prolongée des gènes *CMYC* et *IGH* peut faciliter leur translocation, car le mécanisme de recombinaison considéré comme responsable principal des translocations, nécessite la proximité des partenaires de la recombinaison. Pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude de la capacité des virus EBV et VIH-1 à rapprocher les gènes portés par deux chromosomes différents et distants afin d'induire leurs translocations et par voie de conséquence favoriser un BL. Le travail de ma thèse se divise donc en deux grands axes : 1- le rôle du virus EBV dans la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène *IGH* codant pour les chaines lourdes d'immunoglobuline, 2- le rôle du virus VIH-1 dans la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène *IGH*.

Nos résultats montrent que les virus EBV et VIH-1 sont capables d'induire la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène *IGH* dans les lymphocytes B infectés. Nous avons aussi montré que la protéine Tat-VIH-1 est capable seule d'augmenter le nombre de colocalisations *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B. Nous avons déterminé que la protéine

Tat délocalise non seulement *CMYC* à proximité d'*IGH* mais aussi *CMYC* du côté de la machinerie transcriptionnelle ARN polymérase II. Enfin, nous avons montré l'effet de Tat-VIH-1 sur la modification de la structure de la chromatine dans les lymphocytes B.

Mots clés

Lymphome de Burkitt, proximité, translocation, *CMYC*, *IGH*, EBV, VIH-1 et Tat-HIV-1.

ABSTRACT

Eighty percent of Burkitt's lymphomas (BL) cases bear translocation t(8;14)(q24;q32). This translocation is the initial event in malignant transformation of normal B-cell and derives from non-homologous end joining of the oncogene *CMYC* to the immunoglobulin heavy chain locus *IGH* during Somatic Hypermutation (SHM) of *IGH*. The probability of this translocation is inversely proportional to the distance between the loci of involved chromosomes (Nikiforova et *al.,* 2000). Peter Fraser's work showed that the activation of mice B lymphocytes leads the increase of the colocalization between Igh / cMyc (Osborne and al., 2007), can increase the risk of translocation between these two genes. Indeed, a nuclear proximity of the involved genes, normally localized in different chromosome domains, could be a factor favoring a genic recombination.

Several hypotheses connect the role of Epstein-Barr virus (EBV) and the human immunodeficiency virus (HIV-1) in triggering the BL. Previous studies have highlighted the impact of EBV infection on the transcriptional machinery where the proto-oncogene *CMYC* is activated by the transactivator EBNA2 (EBV nuclear protein) (Kaiser et *al*., 1999). More recent results have shown that EBV infection responsible for the change in the chromatin territories organization of chromosomes 17 and 18 in B lymphocytes (Li C et *al*., 2010). Activation of B lymphocytes in mice induces increased colocalization between *IGH-CMYC* (Osborne et *al*., 2007), thus increasing the risk of translocation.

HIV-1 is capable of stimulating the proliferation of naive B cells by interaction between gp120 (HIV-1 receptor) and CD21 (CR2) B cells receptor. (Moir S, 2002) thus increasing the risk of lymphoproliferation. It has been shown that the protein Tat secreted by HIV-1 infected cells can penetrate through the membrane of other cell types (Debaisieux et *al*., 2011). Tat can also interact with the human genome inducing deregulation of different genes including *CMYC* (Mc Arthur *et al,* 2001) (Marban *et al.,* 2011). Other studies have also shown that Tat is able to stimulate oxidative stress *in vitro* (Penza et *al.*, 2008) causing DNA breaks and subsequently increasing the risk of translocations. It has also been suggested that the HIV Tat protein induce a deficiency in the double-strand breaks repair and may be responsible for the development of HIV-associated cancers (Nunnari et *al*., 2008). Tat can affect the disposition and the remodeling of the chromatin (Verdone et *al.,* 2005) inducing a change in nuclear organization and subsequently increasing the risk of translocation. In addition, it was shown

that 30% of Tat-transgenic mice are capable of developing a lymphoma type B (Kundu et *al*., 1999).

We first studied the position of *CMYC* loci (8q24) and *IGH* (14q32) in human naive B cells by Fluorescence in situ hybridization (FISH). *CMYC* is pericentral in the nucleus, whereas *IGH* is more central with only 4.7% *IGH-CMYC* colocalisation. Prolonged proximity between *IGH* and *CMYC* genes can facilitate translocation that occurs mainly by non-homolgous end joining requiring physical proximity. We were interested in studying the ability of viruses to bring two distant chromosomes together to induce their translocation and consequently develop BL. My thesis is dedicated to two main topics: 1- The role of EBV in the relocalization of the *CMYC* oncogene towards the *IGH* locus encoding the heavy chain *IGH*. 2- The role of HIV in the relocalization of the *CMYC* oncogene towards the *IGH* locus encoding the heavy chain *IGH.*

We have studied the position of the genomic regions involved in the development of BL by Fluorescent in situ hybridization in normal B-cells and those treated with EBV and HIV with the aim to observe perturbations in the nuclear architecture induced by these viruses. We first studied the distribution of genes of interest in the kinetics of naive B cells and those infected by EBV. We observed increased colocalization of *CMYC* and *IGH* as well as *CMYC* activation upon EBV infection.

We have next studied the gene localization in the kinetics of B cells treatment by the HIV-1 viral supernatant and found that it increased the spatial proximity of *IGH* and *CMYC* tenfold. Next we tried to determine which of the HIV-1 components was responsible for the observed gene relocalization and found that HIV-1 Tat protein was capable to induce the observed colocalization alone. Tat also triggers chromatin remodeling in treated cells.

Our studies will help to better understand the roles of HIV-1 and EBV in BL lymphomagenesis.

Keywords
Burkitt lymphoma, proximity, translocation, *CMYC*, *IGH*, EBV, HIV-1 and Tat HIV-1.

INTRODUCTION

1. NOYAU INTERPHASIQUE

Le noyau fut la première structure cellulaire découverte en 1802 et a été ensuite étudié par Robert Brown en 1831. L'analyse du noyau est possible par différentes approches. L'étude de son ultrastructure par microscopie électronique et par la microscopie à fluorescence a montré que c'est un compartiment séparé par une membrane communiquant avec le cytosol par des pores. Toutes les macromolécules entrent et sortent par des mécanismes actifs de transport. En dehors de son rôle qui est de contenir la majeure partie de l'ADN de la cellule le noyau joue aussi un rôle principal dans les mécanismes de la réplication, la transcription et l'épissage, comportant toutes les informations qui gouvernent les fonctions vitales de la cellule (Figure 1). Le Noyau est le centre organisateur de la cellule, c'est l'organite qui a donné le nom aux eucaryotes (eu = vrai, caryos = noyau). Le noyau est organisé en domaines, ou microenvironnements, qui peuvent contribuer à la régulation de toutes les fonctions du génome.

Le noyau est un organite hautement compartimenté. Les éléments les plus caractéristiques du noyau interphasique sont :

- L'enveloppe ou membrane nucléaire qui sépare physiquement et métaboliquement l'intérieur du noyau du reste du cytoplasme.

- Le nucléoplasme (ou suc nucléaire) qui remplit la plus grande partie de l'espace nucléaire.

- L'euchromatine qui est présente sous la forme d'amas peu denses et peu visibles au microscope électronique.

- Les chromocentres qui correspondent aux régions denses de chromatine condensée ou hétérochromatine.

- Le ou les nucléoles de forme généralement sphériques.

Les chromosomes en interphase sont organisés en domaines spécifiques dans le noyau.

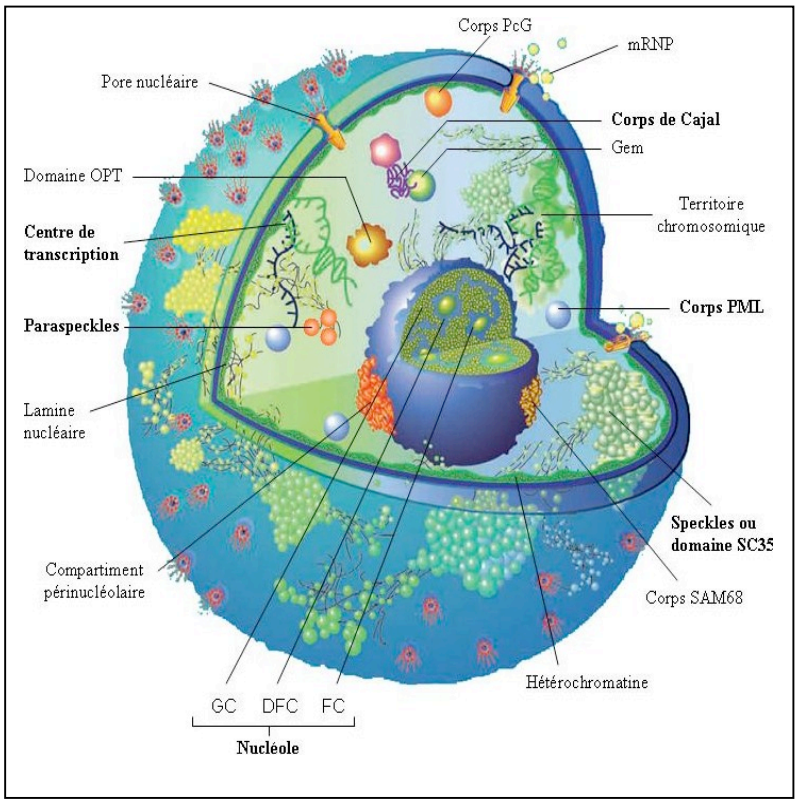


Figure 1. Représentation schématique tridimensionnelle de l'organisation d'un noyau de cellule eucaryote (Spector, 2001).

1.1. Architecture du noyau et territoires chromosomiques

Le noyau cellulaire est à présent considéré comme un compartiment complexe et finement organisé au sein duquel les éléments tendent à occuper des positions non-aléatoires, définissant le concept d'architecture nucléaire. La disposition spatiale du génome et de ces protéines régulatrices dans le noyau, bien que mal comprise, est maintenant reconnue comme point de contrôle majeur de la transcription. La connaissance complète de cette organisation et de son impact sur l'expression des gènes semblent indispensables pour expliquer pleinement des phénomènes tels que la différenciation et le développement des cellules, et la maladie. La désorganisation de cette architecture apparaît de plus en plus comme caractéristique de nombreuses pathologies, notamment en ce qui concerne les cancers.

1.1.1. Historique

A la fin du 19e siècle, plusieurs études microscopiques visaient à étudier la structure nucléaire ainsi que l'architecture des chromosomes mitotiques. En 1885, Carl Rabl donna ses premières suggestions montrant que le noyau cellulaire dispose de territoires chromosomiques

(CTs), et émit l'hypothèse que la posture des chromosomes est conservée tout au long de l'interphase, formant des domaines nucléaires distincts. En 1909, Theodor Boveri émit les principales hypothèses concernant ces territoires chromosomiques, la première étant que les territoires chromosomiques étaient maintenus de façon stable durant l'interphase et la seconde étant la conservation de l'arrangement des territoires chromosomiques entre la cellule mère et les deux cellules filles. En effet, Boveri remarque qu'après la première mitose, les chromosomes des œufs d'*Ascaris megalocephla* (un nématode parasite intestinal du cheval) ont les mêmes conformations et positions relatives dans les deux cellules filles. Au début du 20e siècle, des opinions différentes sur l'organisation structurelle de territoires chromosomiques ont été suggérés.

Cependant, la microscopie électronique (apparue au milieu des années 1950) ne révéla pas la présence de domaines chromosomiques individuels, et l'existence même de ces territoires est alors remise en cause. Ainsi, la plupart des chercheurs dans les années 1970-80 étaient convaincus que le noyau était rempli d'un entremêlement et de boucles de chromatine. C'est depuis 1977 que David Comings chercha à comprendre comment à partir du désordre apparent que constitue la chromatine en interphase pouvait se produire un phénomène aussi ordonné et précis que la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire.

Dans les années 70, Thomas et Christophe Cremer ont étudié la structure du chromosome en interphase dans le noyau. Pour ce faire, ils ont irradié par un laser UV des cellules de hamster chinois de manière à créer des cassures dans l'ADN (Figure 2). De la thymidine traitée est ensuite ajoutée à la culture pendant 2h, de manière à marquer les portions de chromatine ayant réparé leur ADN. Puis, plusieurs heures après, la distribution de la zone irradiée est analysée sur des noyaux en interphase ou sur des préparations métaphasiques. Le résultat de cette expérience montre (i) que la taille de la zone irradiée change peu au cours du temps, démontrant l'absence de dilution de la chromatine irradiée dans le noyau et (ii) que seuls quelques chromosomes métaphasiques (en moyenne 4) sont radio-marqués (Cremer and Gray, 1982; Zorn et *al*., 1979). Cette expérience suggère que les différents chromosomes occupent des territoires distincts en interphase.

L'équipe de S. Stack démontra par plusieurs expériences que les chromosomes étaient contenus dans un espace nucléaire précis (Cremer and Cremer, 2001). En 2005, par des expériences d'hybridation in situ (FISH), il a été montré que la chromatine est hautement

organisée avec l'identification des différents territoires chromosomique humains (Bolzer et *al*., 2005).

Grâce à des sondes couvrant l'intégralité d'un chromosome, il a été possible de visualiser directement le volume occupé par un chromosome en interphase (Schardin et *al*., 1985) et de remarquer que celui-ci occupe un territoire défini dans le noyau. L'hybridation in situ fluorescente utilisant un marquage spécifique pour chaque chromosome étudié, il a permis de visualiser simultanément plusieurs chromosomes d'un eucaryote supérieur (Cremer and Cremer, 2001; Habermann et *al*., 2001) et d'analyser leur agencement les uns par rapport aux autres. Il a ainsi été remarqué que les territoires chromosomiques ne sont pas disposés aléatoirement dans le volume nucléaire et confirmé que chaque chromosome dispose d'un territoire bien défini (Bolzer et *al*., 2005; Habermann et *al*., 2001).

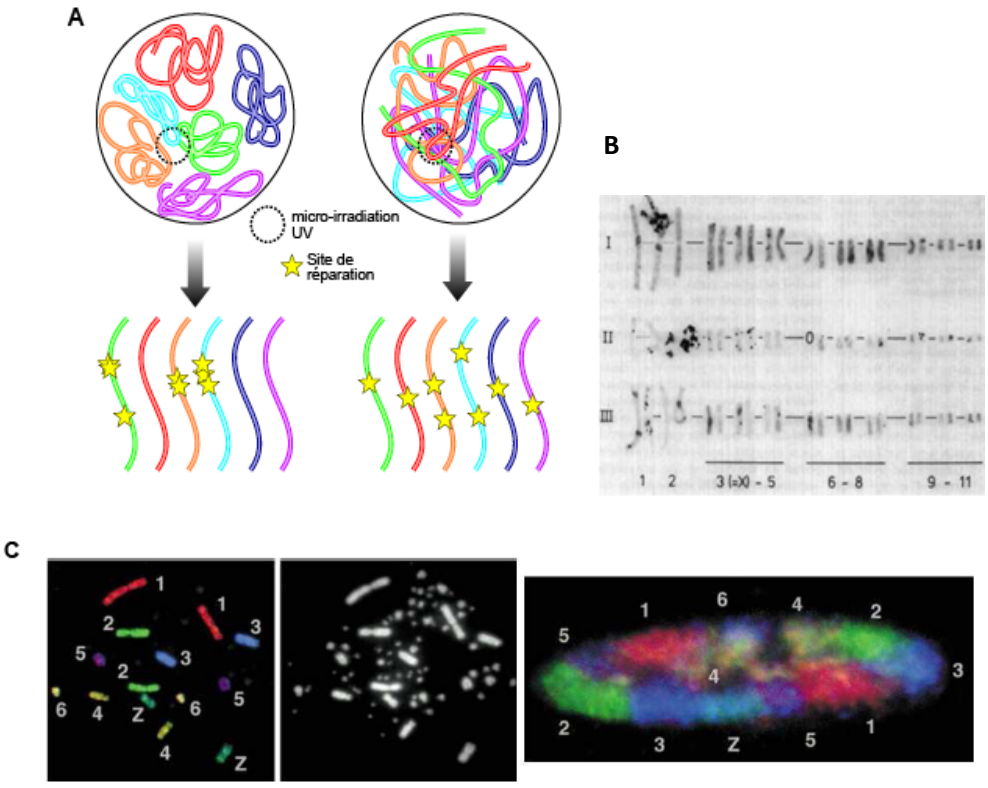


Figure 2. L'existence de territoires chromosomiques. A- Conséquence d'une microirradiation laser des fibroblastes de hamster chinois sur l'organisation des chromosomes dans le noyau (selon deux modèles d'organisation). Les sites de réparation sont observés grâce à de la thymidine tritiée. Le nombre de chromosomes ayant subi une ou plusieurs cassures doubles brin. **B-** Caryotype obtenu de l'expérience (A) (Zorn et *al*., 1979). C- Marquage fluorescent simultané des 7 chromosomes de poulet (Habermann et *al*., 2001).

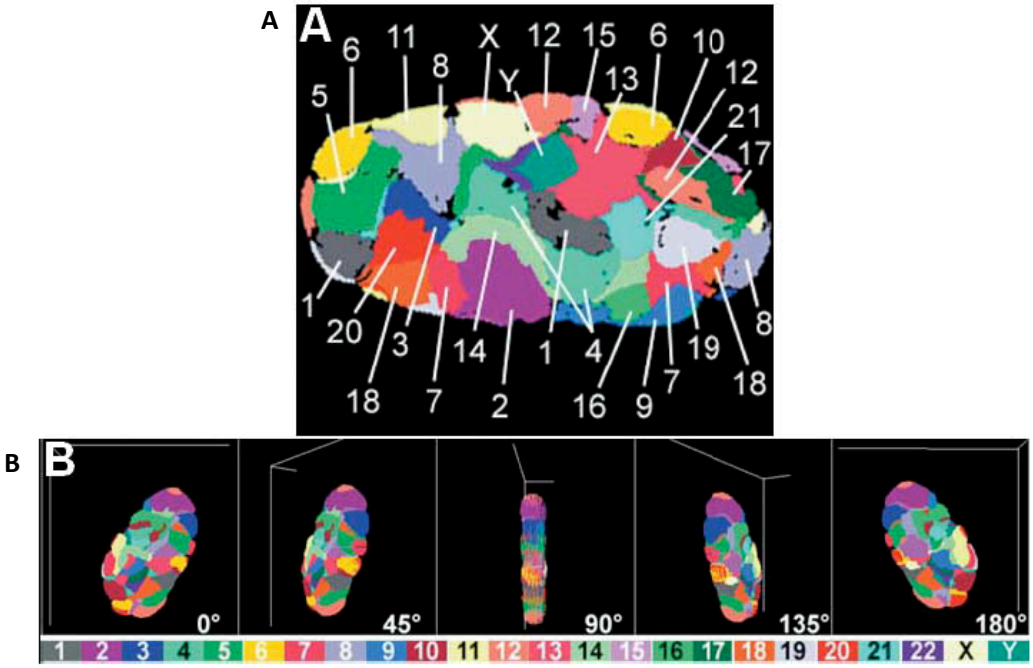


Figure 3. Positionnement des chromosomes dans un noyau de fibroblaste humain (Bolzer et *al*., 2005) **A.** Représentation en fausses couleurs de tous les territoires chromosomiques visibles dans une section médiane du noyau. Les numéros des différents chromosomes sont indiqués. **B.** Reconstruction en 3D de l'arrangement des territoires chromosomiques dans le noyau sous différents angles.

1.2. L'organisation du territoire chromosomique corrèle avec la taille des chromosomes et la densité des gènes

L'organisation des chromosomes dans le noyau est encore controversée. Il semble néanmoins que la localisation nucléaire des chromosomes est corrélée à leur taille et à leur densité en gènes (Boyle et *al*., 2001). En effet, les petits chromosomes humains riches en gènes sont retrouvés au centre des noyaux alors que les grands chromosomes pauvres en gènes adoptent une position plus périphérique (Boyle et *al*., 2001; Tanabe et *al*., 2002). Il a notamment été montré que les régions peu transcrites sont retrouvées à la périphérie (Cremer et *al*., 2001; Skalnikova et *al*., 2000): le chromosome 8 qui contient le gène *CMYC* est pauvre en gènes et se retrouve à proximité de la membrane nucléaire alors que le chromosome 14 contenant le gène *IGH*, riche en gènes, a une position plus centrale (Croft et *al*., 1999). Au sein d'un CT, la position d'un gène est déterminante pour son activité.

Ceci s'applique à tous les noyaux puisque l'agencement des territoires chromosomiques peut varier d'un type cellulaire à l'autre (Parada et *al*., 2004). Par exemple, le chromosome humain 18 et 19 ont à une taille proche (respectivement 77 et 63 Mb) mais possèdent une densité en gènes complètement différente (3 fois plus de gènes par Mb sur le chr 19 que sur le chr 18). Le chromosome 18, pauvre en gènes, présente une localisation nucléaire périphérique alors que le chromosome 19, riche en gènes, est localisé en position centrale au sein du noyau (Croft et *al*., 1999). Ces observations ont été confirmées par l'équipe de Cremer en 2003. Néanmoins, (Bolzer et *al*., 2005) ainsi que (Zeitz et *al*., 2009) (Figure3) n'observent pas de différence significative entre le positionnement du chr 18 et 19 dans des fibroblastes, confirmant que des organisations spécifiques d'un type cellulaire restent possibles.

Cette tendance pour un positionnement des chromosomes en fonction de leur taille/densité en gènes a aussi été observée chez les rongeurs et chez les bovins (Koehler et *al*., 2009; Mayer et *al*., 2005). Afin de savoir à quel moment du développement se mettait en place une telle organisation radiale des chromosomes, (Koehler et *al*., 2009) ont suivi le positionnement du chr 19 bovin (riche en gènes) et du chr 20 bovin (pauvre en gènes) après fécondation *in-vitro*. Ils ont ainsi montré que le positionnement du chr 19 au centre du noyau et du chr 20 en périphérie du noyau ne peut être observé qu'à partir du stade 8-16 cellules, stade à partir duquel débute l'expression du génome zygotique. Ceci indiquerait que le positionnement radial des chromosomes en fonction de leur densité en gène serait relié à la transcription du génome.

Durant la phase S, l'ADN qui est localisé au centre du noyau se réplique en premier. En revanche, l'ADN localisé en périphérie nucléaire se réplique plus tardivement (Habermann et *al*., 2001; Mayr et *al*., 2003; Postberg et *al*., 2005). Il a été montré que, chez différents vertébrés, les fractions de la chromatine riches en GC sont plutôt localisées vers le centre du noyau contrairement aux fractions pauvres en GC (Federico et *al*., 2005; Federico et *al*., 2004; Saccone et *al*., 2002).

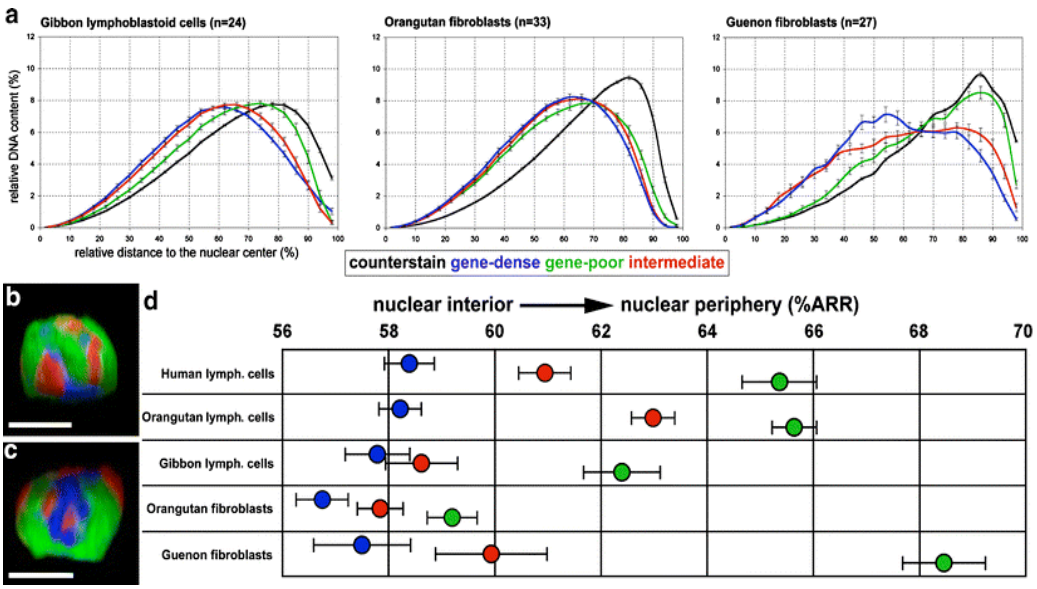


Figure 4. Expérience de marquage du génome des noyaux des cellules primaire de fibroblaste ou lymphoblastoïde (Neusser et *al*., 2007), deux sondes utilisées, une pour le marquage des chromosomes denses en gènes et une autre pour Chromosomes pauvres en gènes. **a)** Exemple d'une évaluation quantitative de la distribution des sondes dans le noyau (n nombre de noyau évalué par expérience) grâce au logiciel 3D-RRD. **b)** chez l'homme et **c)** gibbon noyau des cellules lymphoblastoïdes reconstruit en 3D (échelle=5µm). **d)** Moyennes des sondes pour chaque primate.

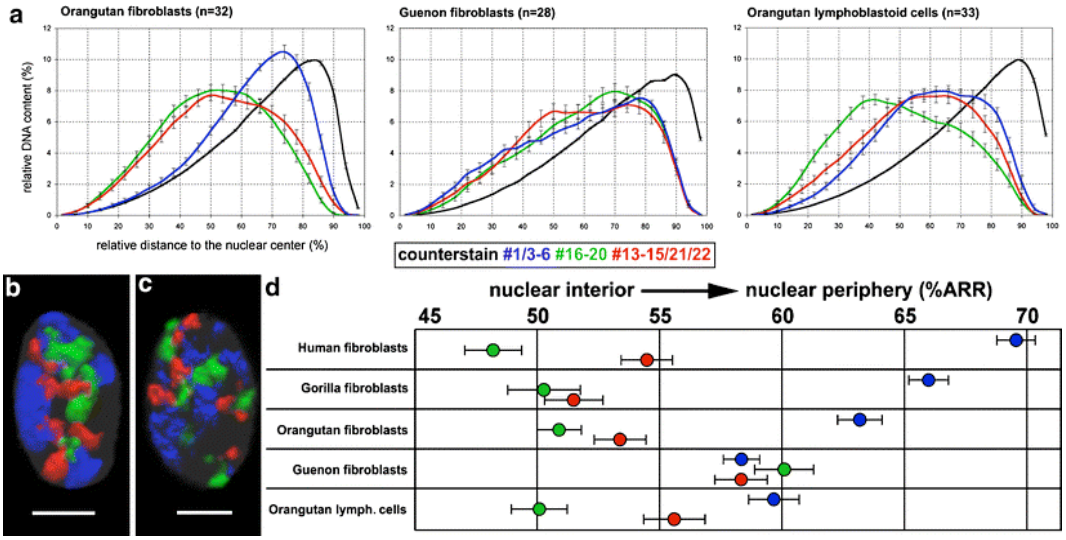


Figure 5. Corrélation entre la taille et la localisation des chromosomes (Neusser **et *al*.,** 2007**). a)** Evaluation de la distribution des sondes qui correspondent à la taille (petit et grand) des chromosomes humains grâce au logiciel : 3D-RRD (n= nombre de noyau évalué par expérience) **b)** et **c)** Représentation en 3D des noyaux de fibroblastes b) humain et c) guenon. **d)** moyenne de la valeur relative des rayons ARR pour chaque groupe de sonde chez les différentes espèces des primates.

1.3. Compartiments nucléaires et régulation de l'expression des gènes

Actuellement, la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes supérieurs s'affine de plus en plus. En effet, l'organisation spatiale du noyau cellulaire est considérée comme régulateur crucial de l'expression des gènes. La position des gènes dans le volume nucléaire semble de plus en plus influencer et être influencée par l'expression des gènes. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance de l'organisation spatiale dans la régulation de l'expression génique. Il a été observé que certains chromosomes avaient une position préférentielle plus ou moins proche du centre du noyau. Certains sont essentiellement localisés en périphérie alors que d'autres sont plus favorablement situés au centre du noyau. En 1998, des scientifiques américains démontrèrent chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) que la position d'un gène dans le noyau peut influencer son activité. Grâce à des manipulations génétiques, ils déplacèrent artificiellement un segment chromosomique portant un gène actif à la périphérie du noyau. Ils constatèrent alors que ce gène n'était plus actif. D'autres travaux décrivant la position radiale des gènes ont montré que leur activation transcriptionnelle (selon le type cellulaire ou le stade de développement par exemple) corrèle avec un repositionnement du locus de la périphérie vers l'intérieur du noyau (Kosak et *al*., 2002; Williams et *al*., 2006; Zink et *al*., 2004). Il apparaît donc clairement que la régulation des gènes est intimement liée à leur positionnement dans l'espace nucléaire, confèrent ainsi un rôle régulateur à l'organisation spatiale du noyau.

a. Enveloppe nucléaire

L'enveloppe nucléaire constitue la barrière physique délimitant le noyau. Cette double membrane et les pores nucléaires qu'elle contient permettent des échanges contrôlés avec le cytoplasme et contribuent ainsi à la régulation de mécanismes cellulaires essentiels comme le contrôle du cycle cellulaire et de l'expression des gènes. L'enveloppe nucléaire participe également à l'organisation de la chromatine et la régulation des gènes par leur positionnement. L'enveloppe nucléaire a initialement été décrite comme un compartiment de mise en silence des gènes (Kosak et *al*., 2002). La répression des gènes est notamment liée à la compaction en hétérochromatine. Cette compaction est réalisée au niveau des ancrages chromatiniens interagissant avec les lamines qui sont attachées à l'intérieure de l'enveloppe nucléaire. Ces domaines sont pauvres en gènes chez la mouche ainsi que chez l'homme (Guelen et *al*., 2008; Pickersgill et *al*., 2006).

b. Hétérochromatine

L'hétérochromatine correspond à la chromatine à l'état condensée. Elle constitue la partie inactive de chromatine au niveau transcriptionnel. En effet, l'hétérochromatine (ou plus précisément ses histones) est schématiquement hypoacétylée et hyperméthylée par rapport à l'euchromatine. Un autre phénomène a été particulièrement étudié, celui du rôle de l'hétérochromatine dans le « silencing » des gènes. L'étude de l'expression de la Beta-globine révèle que lorsque ce locus est situé dans un environnement hétérochromatique (dans les lignées lymphoïdes), il n'est pas exprimé alors qu'il est activement transcrit lorsqu'il est en dehors de cette zone (dans les cellules érythroïdes) (Brown, 2001). Ce phénomène a aussi été observé au niveau des gènes localisés à proximité des séquences télomériques (Baur et *al*., 2001; Koering et *al*., 2002). Le compartiment hétérochromatinien est divisé en deux sous-types: l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive.

- Hétérochromatine facultative peut être définie d'un point de vue moléculaire comme une région génique transcriptionnellement silencieuse présentant une structure chromatinienne compactée.
- Hétérochromatine constitutive reste fortement compactée tout au long du cycle cellulaire, quel que soit le stade de développement et le tissu concerné, elle est donc très peu accessible aux facteurs de transcription.

L'hétérochromatine peut exercer une répression de l'expression génique par la formation et le maintien d'une structure hétérochromatinienne sur le gène cible. Cette répression peut être médiée par propagation de la structure hétérochromatinienne sur les régions codantes adjacentes ou par séquestration de ces régions au sein de compartiments hétérochromatiques répressifs. Les compartiments hétérochromatiques peuvent se comporter comme des réservoirs de facteurs ayant une activité sur la chromatine. Le fait d'avoir des gènes situés à leur proximité grâce à des facteurs spécifiques peut permettre l'établissement d'un statut chromatinien répressif induisant le silencing à long terme et le maintien du ciblage vers ces compartiments.

c. Les usines de transcription : localisation à un compartiment actif

Les chromosomes sont répartis dans des territoires bien définis dans le noyau. Cette distribution est corrélée avec leur activité transcriptionnelle (Lieberman-Aiden et *al*., 2009). Dans le noyau, la transcription a lieu au niveau des régions bien déterminées visualisées par l'incorporation d'analogues d'UTP (BrDU). Ces régions correspondent à des accumulations locales d'ARN-polymérase II et sont appelés « usine de transcription » (Cook, 1999; Cook et *al*., 2002; Sutherland and Bickmore, 2009). Ces usines de transcription, qui seraient d'un nombre supérieure à 1000 (Iborra et *al*., 1996), contiendraient l'ensemble de la machinerie moléculaire requise pour l'expression efficace des gènes actifs, dans un modèle où l'ADN passerait à travers l'usine contenant des polymérases immobiles (Sutherland and Bickmore, 2009) (Schoenfelder et *al*., 2010a). Les usines de transcription étant moins nombreuses que le capital de gènes actifs d'une cellule, il a été proposé que chacune d'entre-elles contiendraient plusieurs gènes exprimés. Ainsi, l'association entre les loci alpha- et beta-globine pourrait s'effectuer au sein de la même usine de transcription (Osborne et *al*., 2004; Schoenfelder et *al*., 2010a). De même, les deux gènes cMyc et IgH chez la souris pourraient partager la même usine de transcription (Osborne et *al*., 2007). Cette colocalisation entre gènes actifs au sein d'une même usine de transcription serait un phénomène fréquent puisqu'en combinant une analyse 4C et un ChIP avec un anticorps dirigé contre l'ARN polymérase phosphorylée (Sérine 5), il a été montré que 90% des loci qui interagissent avec la beta-globine au sein d'une usine de transcription contiennent au moins un gène actif à proximité. De même, 80% des loci interagissant avec l'alpha-globine au sein d'une usine de transcription correspondent à des régions transcriptionnellement actives (Schoenfelder et *al*., 2010b).

Le repositionnement de gènes actifs vers le centre du noyau a été observé pour le locus *IGH* au cours de la différenciation lymphoïde B (Kosak et *al*., 2002). En effet, chez les eucaryotes, l'hétérochromatine est fréquemment située à proximité de l'enveloppe nucléaire. Cette localisation serait potentiellement importante voir nécessaire à sa fonction de régulation de l'expression génique (Andrulis et *al*., 1998; Guelen et *al*., 2008).

Kosak et *al* montrent que les loci des gènes des immunoglobulines, inactifs dans les cellules lymphoïdes pro-T, sont préférentiellement situés à la périphérie nucléaire et colocalisés avec la lamine B, protéine de la membrane nucléaire interne. En revanche, ces mêmes loci sont situés en position centrale dans le noyau des cellules lymphoïdes pro-B (Kosak et *al*., 2002).

L'ensemble de ces données illustrent la complexité de cette organisation nucléaire et son impact sur la régulation de l'expression des gènes.

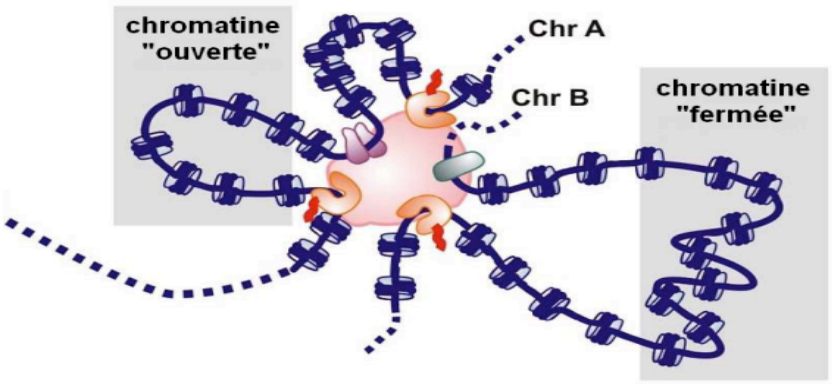


Figure 6. Schéma représentatif d'une usine à transcription (Papantonis et *al*., 2010). Les usines à transcription (en rose) sont des structures polymorphes dans lesquelles les unités de transcription des chromosomes identiques ou différents (Chr) sont liées par les ARN polymérases (en orange) ou les facteurs de transcription. La chromatine «ouverte» est transcrite lorsque les promoteurs (en violet) sont attachés à l'usine; la chromatine «fermée» est éloignée de l'usine et inerte. En vert est présenté un insulateur qui limite la transcription à des séquences définies.

1.4. Organisation nucléaire et translocations

On peut se demander dans quelle mesure l'organisation du génome dans le noyau influence la formation de réarrangements.

1.4.1. Proximité des gènes, translocations et cancer

Les translocations chromosomiques réciproques, échange de fragments chromosomiques entre deux chromosomes homologues ou non homologues, sont fréquemment mises en évidence lorsqu'est effectuée l'analyse chromosomique du tissu tumoral. Ces remaniements sont équilibrés ou non.

On associe la notion de cancer à celles de l'instabilité génomique et des anomalies des voies de réparation de l'ADN (ces dernières interviennent dans la stabilité du génome en empêchant la persistance d'erreurs génomiques pouvant favoriser l'émergence d'un cancer).

Certains réarrangements sont plus fréquemment observés que d'autres pour une pathologie tumorale donnée (notion de récurrence). Les sites de cassure chromosomiques ne sont donc pas aléatoires et des associations entre certains chromosomes semblent privilégiées (Branco and Pombo, 2006).

Il existe une corrélation entre la fréquence des translocations et la proximité physique des loci impliqués dans la translocation. Il a en effet été démontré que la proximité spatiale des territoires chromosomiques dans le noyau favorise les translocations entre chromosomes mais aussi les réarrangements entre gènes : la probabilité de translocation est inversement proportionnelle à la distance qui sépare les deux partenaires géniques.

Le rôle déterminant de la proximité spatiale des chromosomes dans le noyau sur les réarrangements des gènes n'est pas encore formellement confirmé à l'heure actuelle. Les cassures « double brin » ne sont pas mobiles. Il est donc nécessaire que les deux partenaires géniques impliqués dans le remaniement soient à proximité du site de la cassure chromosomique voire en contact ou proches l'un de l'autre sur le plan spatial (Branco and Pombo, 2006). L'organisation spatiale des chromosomes dans le noyau jouerait donc un rôle dans la formation de ces remaniements. Ainsi, la proximité spatiale observée entre les chromosomes 12, 14 et 15 dans des cellules normales de splénocytes de souris expliquerait la formation préférentielle des translocations t(12;14) et t(14;15) dans les cellules lymphomateuses (Parada and Misteli, 2002).

Concernant les lymphomes de type B, le locus *CMYC* est séparé du gène *IGL* (gène des chaînes légères κ), peu fréquemment impliqué dans une translocation avec *CMYC* par une distance évaluée à 47% du diamètre nucléaire. Avec un partenaire génique plus « fréquent » (*IGH*) la distance est moindre, évaluée à 41% du volume nucléaire. Les taux élevés des translocations peuvent être certes liés à la proximité spatiale mais aussi aux mécanismes de réparation des cassures ADN « double brin » qui favorisent, eux aussi, l'avènement d'un remaniement au niveau chromosomique et/ou moléculaire (Branco and Pombo, 2006; Kozubek et *al*., 1999; Lin et *al*., 2009; Mani et *al*., 2009; Soutoglou et *al*., 2007).

2. Les lymphocytes B

Le système immunitaire est un système de défense consistant en un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant à un organisme de discriminer ce qui lui est propre (le « soi ») et de tolérer, ce qui lui est étranger (le « non soi ») afin de le rejeter. Cette fonction permet ainsi d'assurer la défense de l'organisme contre les agents pathogènes (d'origine virale, bactérienne ou parasitaire) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs.

Il existe deux principaux types de mécanismes de défense : les mécanismes de défense non spécifique (ou innée), faisant intervenir les muqueuses, la peau, la sueur, l'acidité gastrique, les cellules phagocytaires (polynucléaires et monocytes/macrophages) ou encore des larmes ; et les mécanismes de défenses spécifiques impliquant l'action des lymphocytes et des immunoglobulines. Parmi ces mécanismes spécifiques, deux types de réactions immunitaires sont distinguées :

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

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

Dans le cadre de notre deuxième partie bibliographique, nous allons développer le chapitre concernant les lymphocytes B, modèle d'étude de notre travail de thèse. Dans un premier temps, nous aborderons la différenciation lymphocytaire B, processus reposant sur un programme complexe d'activation génique contrôlant, d'une part la transcription des gènes d'Ig, et d'autre part leur accessibilité à des remaniements par recombinaison ou mutation. Puis nous sommes plus particulièrement intéressés à la description du locus des gènes codant pour les chaines lourdes des Ig, impliqué dans la translocation t(8;14) avec l'oncogène *CMYC* dans le lymphome de Burkitt.

2.1. Développement des lymphocytes B

Les lymphocytes B interviennent dans la réponse immunitaire humorale et sont à l'origine de la production des anticorps. La maturation des lymphocytes B est associée à des modifications immunophénotypiques caractéristiques. Les cellules B sont produites à partir de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B migrent de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques où ils achèveront leur maturation et leur différenciation. N'ayant eu aucun contact avec un antigène, les lymphocytes qui rejoignent les organes lymphoïdes périphériques sont dit naïfs. L'interaction avec un antigène se produit au niveau des organes lymphoïdes secondaires (réponse immune dépendante de l'antigène) où les lymphocytes B vont proliférer et poursuivre leur différenciation vers le stade plasmocyte ou lymphocyte B mémoire. Au cours de ce processus de maturation s'effectuent les remaniements géniques des parties variables puis constantes des gènes des immunoglobulines. Au sein des organes lymphoïdes périphériques et notamment des ganglions, on retrouve des lymphocytes à différents stades de maturation.

Les ganglions lymphatiques sont composés de follicules, faits de cellules dendritiques, de lymphocytes T et de lymphocytes B. Ces follicules sont dits primaires tant que les lymphocytes B qui les composent sont au repos. Lorsque ces lymphocytes interagissent avec un antigène spécifique, ils entrent dans une phase de prolifération active (expansion clonale) puis de différenciation. Ces lymphocytes activés forment alors un centre germinatif, au sein d'un follicule que l'on appelle, à ce stade, secondaire. Les lymphocytes qui n'ont pas été activés restent à la périphérie des centres germinatifs. On pourrait faire le raccourci suivant : à chaque stade de différenciation correspond une région spécifique ganglionnaire. La classification WHO repose sur ce concept.

Les lymphocytes B peuvent être classés en trois familles principales, en fonction de leur degré de maturation (Figure 7) :

- Les lymphocytes B matures « naïfs » se trouvent, avant leur maturation dans le ganglion lymphatique, dans le pré-centre germinatif dans lequel s'effectue un remaniement génique indépendant de l'antigène.

- Les lymphocytes B matures rencontrent les antigènes dans le ganglion lymphatique. Ils sont retrouvés au niveau du centre germinatif du follicule ganglionnaire (zone sombre et zone claire) où ils se différencient en centroblastes puis centrocytes.

- Les lymphocytes B matures ayant rencontré des antigènes migrent vers la zone du manteau puis dans la zone marginale ou parafolliculaire du ganglion lymphatique (post-centre germinatif (immunoblastes).

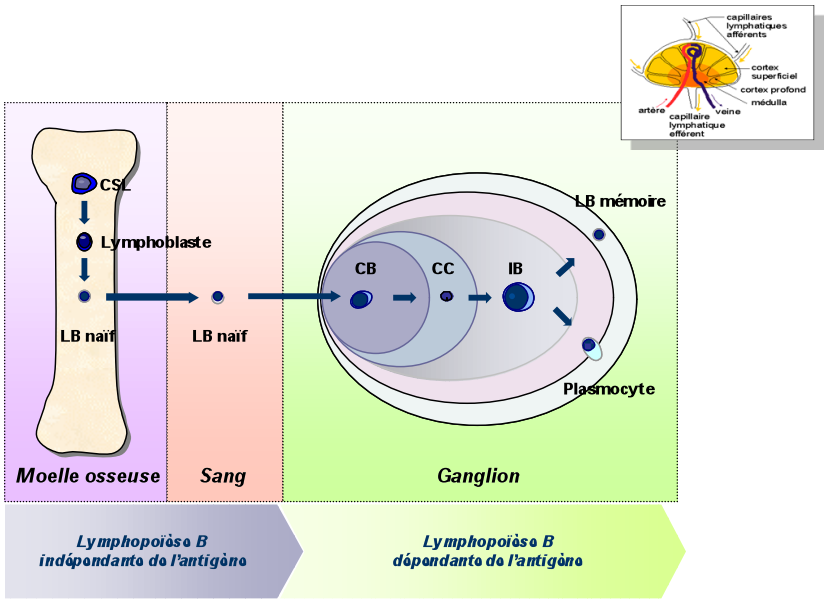


Figure 7. Les étapes de la maturation des lymphocytes B (Médecine Sciences). CSL : cellule souche lymphocytaire ; LB : lymphocytes B ; CB : centroblaste ; CC : centrocytes ; IB : immunoblastes. L'encart correspond à un schéma de l'anatomie d'un ganglion.

2.2. Expression des gènes d'Immunoglobulines

Aux différentes étapes de la maturation des cellules B sont associés des remaniements génomiques des gènes des immunoglobulines (chaîne lourde et légère) dont la finalité est une réponse immunitaire adaptée à l'antigène. Ces modifications dans la structure de l'ADN peuvent induire des erreurs à l'origine d'anomalies chromosomiques, les translocations. Une erreur qui survient au cours de ces différents stades de maturation va induire la production de cellules anormales : la prolifération maligne peut se développer à des stades de maturation variable.

2.2.1. Maturation des lymphocytes B et remaniement V(D)J

La maturation des lymphocytes B est fortement associée aux réarrangements des gènes d'immunoglobulines. Chaque étape de la physiologie du lymphocyte B peut être émaillée d'accidents oncogéniques avec un risque de créer une cellule maligne: lors des processus de réarrangement des gènes codant pour les immunoglobulines. En effet, le mécanisme de remaniement V(D)J codant pour l'expression des gènes d'immunoglobulines constitue la base des événements de translocation chromosomique et donc de certains cancers.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la localisation en 3D nucléaire des gènes d'immunoglobuline codant pour la chaîne lourde (IGH). En effet, ce locus est le siège de plusieurs translocations chromosomiques et donc de certains lymphomes tel que le lymphome de Burkitt.

Le répertoire d'anticorps primaires est obtenu par recombinaison somatique des segments géniques V(D)J dans les loci des chaînes lourdes (IGH) et légères (IGL) d'immunoglobulines. Les cellules « B précurseur » (pro-B puis pré-B), présentes dans la moelle osseuse, subissent des réarrangements des gènes du locus de la chaîne lourde des IgH (segments VDJ) et de la chaîne des IgL. Les cellules exprimant un BCR (B Cell Receptor) fonctionnel de type IgM (cellules B matures) quittent la moelle osseuse et vont dans la circulation périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes. Après contact avec un antigène, ces cellules vont soit se différencier en plasmocytes à courte durée de vie ou former un centre germinatif où seuls les lymphocytes B de forte affinité seront sélectionnés (mécanismes d'hypermutation et de sélection des antigènes). A l'issu de ce processus, les lymphocytes sélectionnés vont se différencier soit en lymphocytes B mémoires soit en plasmablastes qui rejoindront la moelle osseuse où ils termineront leur différentiation en plasmocytes à longue durée de vie.

2.2.1.1. Remaniement V(D)J codant pour la chaine légère (IGL)

Chez l'homme, l'ensemble des gènes responsables de la synthèse de la chaîne légère sont localisés sur les chromosomes 2 (2p12) et 22 (22q11). Il en existe 2 types de chaînes: kappa (κ) et lambda (λ). Ces dernières sont communes aux 5 isotypes d'anticorps. Elles présentent entre elles environ 40% d'homologie. Les chaînes κ sont majoritaires, elles représentent 60% des chaînes légères totales pour l'ensemble des anticorps humains mais ce taux varie d'une espèce à l'autre (la souris exprime 95% de chaînes κ) (Combriato and Klobeck, 2002).

Les loci des gènes codant pour les chaînes légères kappa (κ) et lambda (λ) réarrangent d'une façon très simple, du fait que les chaînes légères sont dépourvues de segment D. En d'autres termes, la première étape de la recombinaison des chaînes légères concerne les segments V et J pour former un complexe VJ, avant l'addition du segment constant de la chaîne légère lors de la transcription (Figure 8).

2.2.1.2. Remaniement VDJ codant pour la chaine lourde (IGH)

Concernant les chaînes lourdes, chez l'homme, l'ensemble des gènes responsable de leur synthèse sont situés sur le chromosome 14 (en 14q32) (Figure 9).

Les réarrangements géniques débutent, dans les précurseurs des cellules B, par le locus des gènes des chaînes lourdes. La synthèse d'une chaîne lourde nécessite l'intervention de quatre types de gènes : un segment VH (variable), un segment DH de diversité, un segment JH de jonction et un segment CH qui code la partie constante. Dans un premier temps, un segment D est associé avec un segment JH, puis un des nombreux gènes VH est alors associé à l'ensemble D-JH (Alt et *al*., 1992).

Dans les lymphocytes B en phase de développement, la première recombinaison qui a lieu, se produit entre un segment D et un segment J d'un locus de chaîne lourde. La diversité initiale des chaînes lourdes, les segments DH joignant les segments JH, a lieu dans les cellules pro-B. Ceci est suivi par la recombinaison d'un gène VH avec le segment DJH, qui aboutit à un réarrangement complet VDJH. Le succès de la recombinaison aléatoire V(D)J des gènes d'immunoglobulines, grâce aux activités enzymatiques spécifiques de lignée des protéines RAG et TdT, aboutit a l'émergence de lymphocytes B immatures porteur de récepteurs aux antigènes

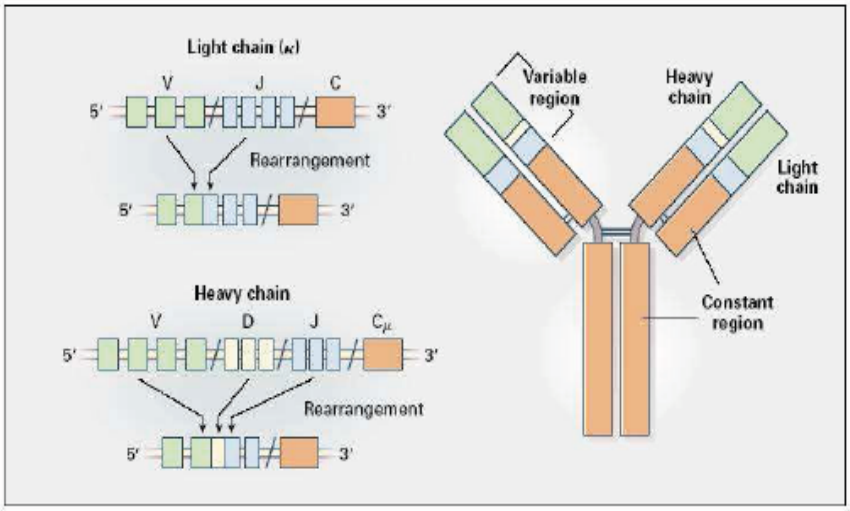


Figure 8. Réarrangements des chaînes légères et lourdes d'immunoglobulines par recombinaisons somatiques des segments V(D)J. L'ADN entre les éléments réarrangés est deleté. Les gènes réarrangés codent pour les molécules constituant les immunoglobulines.

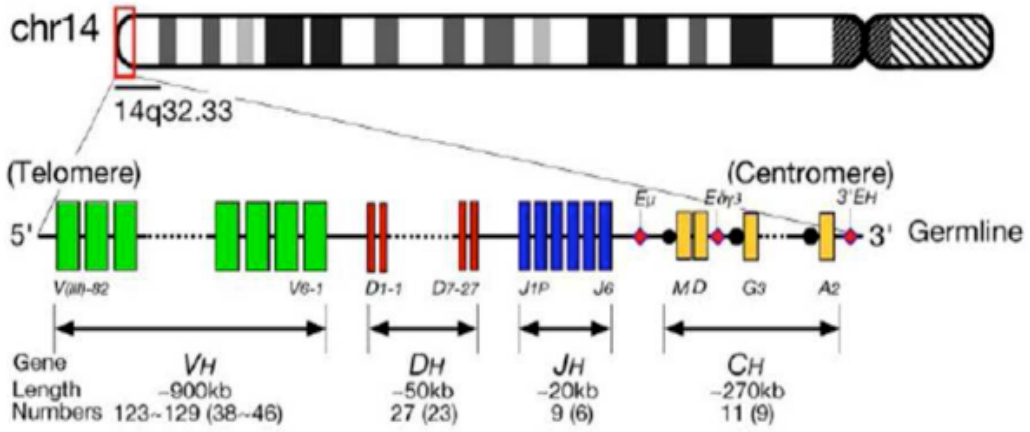


Figure 9. Le locus des chaines lourdes d'immunoglobulines (IGH). Schéma du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines. Les rectangles représentent les régions variables (en vert), de diversité (en rouge), de jonction (en bleu), constantes (en jaune) du locus IGH. Les losanges roses représentent les enhancers (Dyer et *al*., 2009).

2.3. Les mécanismes de la recombinaison et de l'hypermutation somatique

Le remaniement nécessite un système enzymatique adapté pour exciser la séquence comprise entre deux gènes et l'expulser hors de la cellule qui modifie son génome. Ce

système doit être capable de couper, liguer, rajouter des nucléotides ce qui est fait selon le mécanisme de la recombinaison V(D)J (voir la partie précédente) et de l'hypermutation somatique.

- Dans la moelle osseuse

Certaines des enzymes impliquées dans la recombinaison V(D)J sont des composants typiquement lymphoïdes tels que RAG1 et RAG2 (Corneo et *al*., 2001; Schatz et *al*., 1989). Ces deux enzymes sont responsables des cassures de l'ADN au cours du remaniement VDJ dans la moelle osseuse.

On peut citer la DNA-PKc (Blunt et *al*., 1995), l'hétérodimère Ku70-Ku80 (complexe Ku) (Smider et *al*., 1994; Taccioli and Alt, 1995), Artemis (Moshous et *al*., 2001), XRCC4 et la DNA ligase IV (Grawunder et *al*., 1998; Moshous et *al*., 2001). Ces protéines sont impliquées dans la réparation des coupures double brin dans l'ADN et dans la recombinaison V(D)J. La recombinaison V(D)J commence par l'introduction des cassures « double brin » au niveau des séquences RSS (Recombination Signal Sequence) de l'ADN des lymphocytes par les recombinases RAG1 et RAG2 (Recombinase Activating Genes). Ces dernières sont ensuite reconnues par des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN (Hefferin and Tomkinson, 2005; Weterings and Chen, 2008).

La sous-unité catalytique de la DNA-PKc et l'hétérodimère Ku70-Ku80 s'associent et se lient aux extrémités d'ADN (Jeggo, 1998; Weterings and Chen, 2008). La DNA-PKc va ensuite s'autophosphoryler et changer de conformation. Ce changement va alors modifier l'orientation de l'ADN cible le rendant accessible à Artemis (Goodarzi et *al*., 2006). Grâce à son activité endonucléase, cette protéine ouvre les extrémités codantes en épingle à cheveux (Ma et *al*., 2002). La désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) et les polymérases μ et λ, toutes trois appartenant à la famille des polymérases X (Pol X), interviennent alors. Bien que ces trois polymérases aient des structures très proches (Reynaud et *al*., 2001), leurs rôles sont distincts et ne peuvent pas être interverties (Bertocci et *al*., 2006). En effet, la TdT ajoute des nucléotides aux jonctions VH-D et D-JH formant des régions dites régions N (Gilfillan et *al*., 1993; Komori et *al*., 1993).

La polymérase μ intervient lors du réarrangement des gènes des chaînes légères, mais pas des chaînes lourdes, à un stade où la TdT n'est plus exprimée (Bertocci et *al*., 2003). Cette

polymérase contribuerait à l'homogénéité de longueur des CDR3 des chaînes légères. Quant à la polymérase, elle est recrutée lors du réarrangement des gènes des chaînes lourdes avant que la TdT n'agisse (Bertocci et *al*., 2006). La polymérase aurait pour fonction de maintenir une grande hétérogénéité de jonction dans les chaînes lourdes. Une fois l'action de ces polymérases accomplie, le complexe XRCC4-DNA ligase IV relie les segments d'ADN codants (Gu et *al*., 2007) (Figure 10).

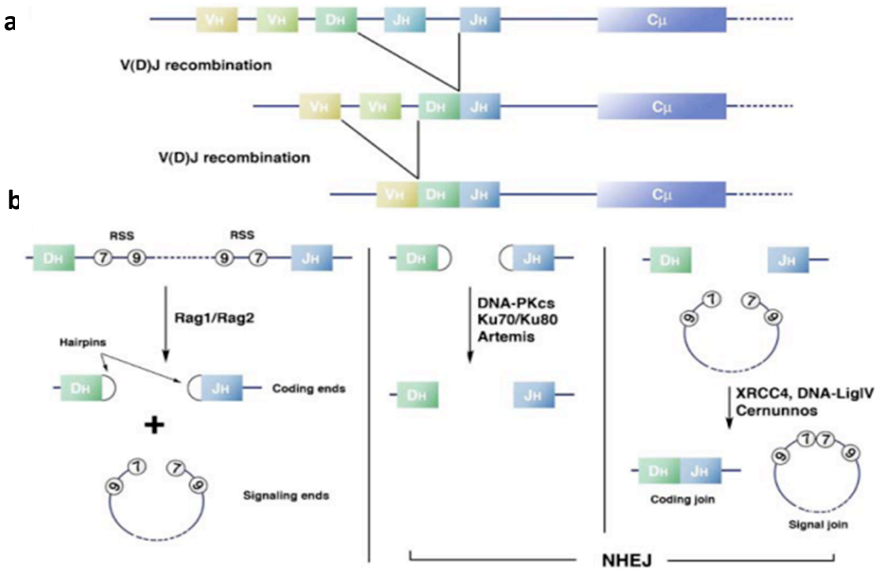


Figure 10. Recombinaison V(D)J. a) Représentation schématique du processus de recombinaison V(D)J dans le locus IGH. **b)** La recombinaison V(D)J peut être divisé en 3 étapes. Le complexe RAG1/2 introduit des CDBs à la bordure des segments VH et DH et de leur RSS respectif, créant deux extrémités en épingle à cheveux (hairpins) et deux extrémités à bords francs. Artemis, recrutée et phosphorylée par la DNA-PKcs, ouvre ces hairpins grâce à son activité endonucléase. Le complexe XRCC4/Cernunnos/DNA Ligase IV permet la ligation de ces nouvelles extrémités (Soulas-Sprauel et *al*., 2007).

- Dans les centres germinatifs

Le processus d'hypermutation somatique des gènes variables (V) des immunoglobulines est un mécanisme majeur de diversification du répertoire des lymphocytes B permettant de lutter d'une manière très spécifique contre les antigènes. La SHM des gènes des immunoglobulines s'effectue dans les lymphocytes B en prolifération dans les centres germinatifs.

La spécificité et l'affinité de l'anticorps membranaire sont dues principalement à un phénomène d'hypermutations somatiques : la recombinaison génétique des immunoglobulines va faire apparaître des mutations dans sa séquence qui vont ajuster les régions hypervariables à l'épitope. La SHM est initiée par une enzyme appelée l'AID (activation-induced cytidine deaminase). Cette enzyme induit des mutations ponctuelles en remplaçant le groupement Cytosine par le groupement Uracile au niveau des gènes V, provoquant des lésions au niveau de l'ADN. Les cassures de l'ADN sont réparées par les mécanismes de réparations (décrits en détail dans le paragraphe de la moelle osseuse). Dans notre étude nous nous sommes focalisés, seulement sur le mécanisme NHEJ car il constitue l'origine officielle des translocations chromosomiques (Figure 11).

Nous nous sommes intéressés spécialement à cette étape de maturation des lymphocytes B. En effet, dans notre travail nous avons étudiés les effets de l'activation et des virus sur la dynamique nucléaire dans les lymphocytes B.

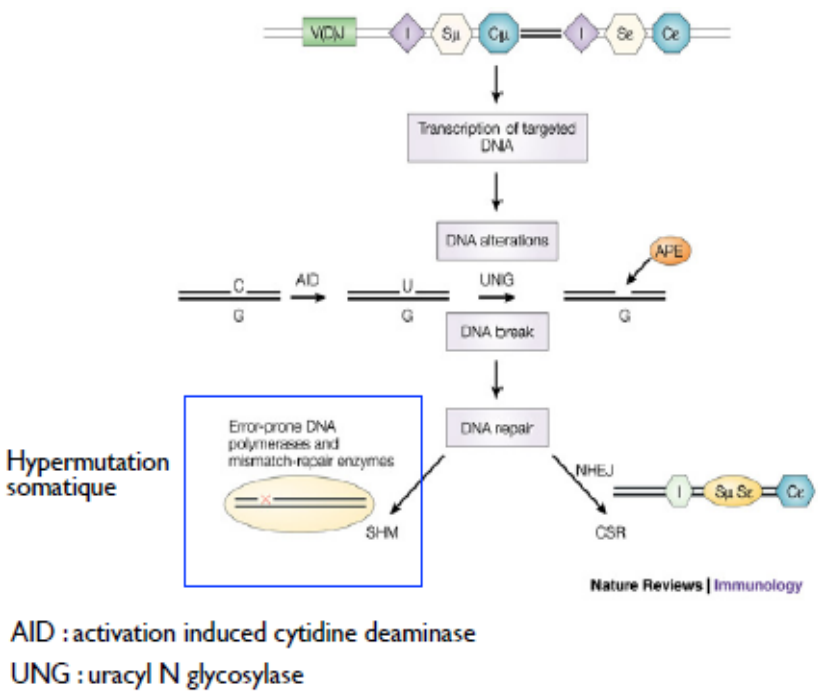


Figure 11. Mécanisme de l'hypermutation somatique. Une transcription de l'ADN se produit avant la mutation. La SHM se traduit en deux étapes : 1) La première dépend de l'AID (activation-induced cytidine deaminase) qui transforme les C en U dans l'ADN. 2) Les bases U vont être excisées de l'ADN se traduisant par des coupures au niveau de l'ADN. Ces coupures vont être réparées par les mécanismes de réparations des cassures double brin non-homologous end joining (NHEJ) (Review Nature Immunology).

2.4. Cassures double brin (CDBs)

L'ADN subit en permanence des lésions : plusieurs dizaines de milliers de lésions surviennent ainsi en moyenne par cellule et par jour. Des mécanismes de réparation efficaces permettent de réparer ces lésions, afin de protéger l'intégrité de son matériel génétique. En effet, l'ADN dans la cellule est continuellement exposé à un dommage provenant de sources exogènes tels que les radiations ultraviolettes émises par le soleil (UV), les radiations ionisantes et certains agents thérapeutiques ou à des sources endogènes comme les stress mécaniques (McClintock, 1941), les transpositions (Engels et *al*., 1990), la méiose responsable de la génération de la diversité génétique (Keeney and Neale, 2006), la réplication de l'ADN et les mécanismes de diversification des immunoglobulines dans les lymphocytes (Maizels, 2005) (Figure 12).

Les dommages de l'ADN peuvent générer des mutations ou dégradations de bases, des pontages de l'ADN, des cassures simple-ou double brin de l'ADN (CDB). Les CDBs qui constituent des lésions létales majeures, peuvent être source d'instabilité génétique. Deux mécanismes entrent en compétition pour la réparation des CDBs : la recombinaison homologue (HR) et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ).

Le mécanisme de réparation des CDBs : NHEJ est principalement responsable des translocations chromosomiques. En effet, ce mécanisme constitue la principale source de problème génétique au cours de la réparation des lésions surtout celles induites lors du réarrangement V(D)J codant pour la chaîne lourde ou légère des immunoglobulines.

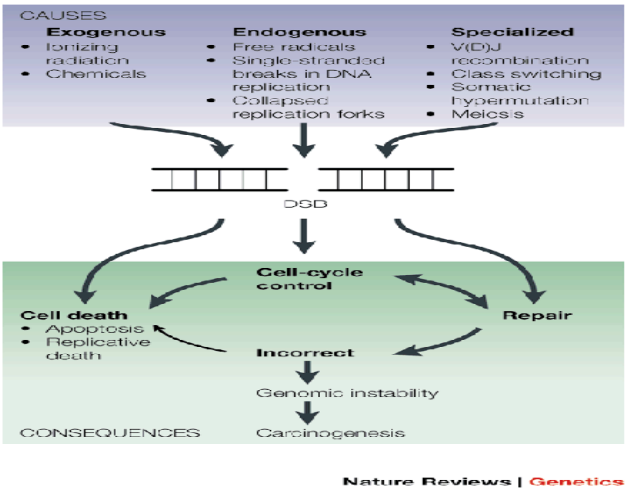


Figure 12. Causes, réponse cellulaire et conséquences des cassures double-brin de l'ADN. Les CDBs de l'ADN peuvent avoir une origine endogène ou exogène ou elles peuvent être produites par certains mécanismes de recombinaison spécialisés. La réponse aux dommages de l'ADN est très complexe et dépend de la coordination entre les mécanismes de réparation et l'activation des check points. Si les dommages sont excessifs, la cellule se dirige vers la mort cellulaire. La fidélité de la réparation est extrêmement importante puisque une réparation incorrecte entraine une instabilité génétique qui peut contribuer à la carcinogenèse (van Gent et *al*., 2001).

2.4.1. Cassures doubles brins CDBs, réarrangement V(D)J et hypermutation somatique

Les cassures doubles brins font également partie des mécanismes moléculaires très complexes, comme la recombinaison V(D)J dans les lymphocytes, un événement physiologique indispensable pour créer les anticorps spécifiques contre un pathogène (voir dessus). Ces cassures provoquées au moment de la recombinaison V(D)J sont responsables de la variabilité au sein des lymphocytes.

La recombinaison V(D)J met en « continuité » un des membres de chaque famille génique V, D et J, chacun en relative proximité l'un de l'autre sur un locus de grande taille utilisant les mécanismes sus-cités, la recombinaison V(D)J peut dysfonctionner et être à l'origine de translocations chromosomiques si d'autres gènes se situaient à proximité spatiale du site de la recombinaison. Le locus IGH, remodelé tout au long du développement des lymphocytes B, est donc une zone critique de remaniements. Ceux-ci peuvent se produire aux trois moments clés de la maturation B : 1) pendant la recombinaison entre les segments géniques D et J ; 2)

après la recombinaison, au cours de l'hypermutation somatique dans les centre germinatifs, au niveau des segments V(D)J réarrangés ; 3) dans les régions de commutation de classe.

On individualise trois types de cassure au niveau des loci des Ig :

- les points de cassures sont directement adjacents à la région JH et se produisent lors de la jonction entre la région DH et la région JH. Ce type de translocation intervient lors des processus de recombinaison V(D)J et serait donc restreint aux cellules B précurseurs de la moelle osseuse. De tels réarrangements peuvent survenir dans le centre germinatif (lymphome folliculaire, t(14;18) (*IGH-BCL2*) par exemple) ((Meffre et *al*., 1998).

- les points de cassure sont localisés au niveau des sites de jonction V(D)J , là où siègent les mutations somatiques, indiquant que la translocation a eu lieu au moment de l'hypermutation somatique (SHM) se déroulant principalement dans les centres germinatifs.

- le troisième type de translocation est caractérisé par la présence d'un point de cassure dans la région « switch » des régions constantes, suggérant que cet événement se produit lors de la recombinaison des classes switch (CSR).

2.4.2. La réparation des cassures doubles brins et les translocations

Les CDBs, la proximité entre les fragments issus des différents chromosomes, et le mécanisme de réparation NHEJ mentionné dessus sont des conditions favorables pour l'apparition des translocations.

La translocation chromosomique est un échange de matériel génétique entre deux ou plusieurs chromosomes. Ces translocations semblent se produire lors des réarrangements V(D)J, lors des hypermutations somatiques ou lors de la commutation isotypique. Des erreurs lors de remaniements d'ADN peuvent entraîner des translocations chromosomiques, des délétions, des insertions ou des mutations ponctuelles (Kupper et *al*., 1999). Les cancers sont souvent liés à des translocations chromosomiques.

Le clonage des sites de cassure des translocations récurrentes a permis la distinction de deux mécanismes oncogéniques principaux : 1- la fusion de deux gènes créant une protéine de fusion avec des propriétés oncogéniques nouvelles ; 2- la juxtaposition de l'intégralité d'un oncogène avec les éléments régulateurs d'un autre gène, résultant en une activation de l'oncogène. C'est le second modèle qui intervient lors de translocations chromosomiques survenant dans une pathologie lymphomateuse. Des CDBs au niveau de chromosomes non homologues suivi par une réparation aberrante d'ADN sont suggérés comme un mécanisme potentiel de formation des translocations chromosomiques. Le déroulement et les différentes étapes de cette recombinaison chromosomique sont encore peu connus.

La proximité spatiale des gènes réarrangés est essentielle pour l'occurrence de l'échange chromosomique. L'induction de la proximité des loci des gènes *TMPRSS2* et *ERG* dans des cellules de cancer de prostate favorise la fusion de ces deux gènes (Mani et *al*., 2009).

2.5. Les mécanismes de réparation des cassures doubles brins

Les mécanismes de réparation de l'ADN garantissent la stabilité du génome. Les CDBs sont des lésions de l'ADN très délétères pour l'intégrité de la cellule. Une réparation s'impose nécessaire à la survie de la cellule. Les CDBs constituent la forme la plus « néfaste » des dommages ADN. Durant la phase S d'une cellule humaine, une cinquantaine de CDBs apparait (Vilenchik and Knudson, 2003). Ces cassures peuvent être source d'instabilité génétique pouvant mener à la perturbation de la fonction cellulaire et la genèse de certains cancers.

Pour cela deux principaux mécanismes entrent en compétition pour la réparation des ces cassures et le maintien de l'intégrité de nos cellules: la recombinaison homologue et la ligature d'extrémités non homologues (non-homologous end joining, NHEJ) (Gottlieb and Jackson, 1993; Jackson, 2002; Sancar and Reardon, 2004; Valerie and Povirk, 2003). La NHEJ est la voie principale de réparation des CDBs en phase G1 et donc chez les mammifères puisque la plupart des cellules d'un mammifère sont en phase G0/G1.

2.5.1. La recombinaison homologue (RH)

La recombinaison homologue RH est le mécanisme le plus précis, le plus lent et le plus conservateur. La RH a longtemps été considérée comme un mécanisme fidèle de la réparation (car le brin lésé recopie une séquence homologue) car il restaure l'information endommagée

en utilisant une copie intacte de l'ADN de la chromatide sœur ou le chromosome homologue. Ce système est préférentiellement utilisé lors des phases G2 et S. La Figure 13 détaille les différentes étapes de la recombinaison homologue.

2.5.2. Non homologous end joining (NHEJ)

Le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining) est le mécanisme principal de réparation des cassures « double brin » de l'ADN chez les mammifères. La mise en évidence, au niveau des cassures chromosomiques, de délétions et duplications de petite taille ainsi que de micro-homologies caractéristiques de ce mécanisme de réparation a fait émettre l'hypothèse que NHEJ avait un rôle dans la tumorigenèse.

Il s'agit d'un mécanisme de réparation biochimique d'action rapide qui restaure uniquement la continuité de l'ADN endommagé par une cassure « double brin » mais non la séquence génétique. Le mécanisme NHEJ est, à ce titre, mutagène (Abeysinghe et *al*., 2003; Pfeiffer et *al*., 2000). Il est particulièrement utilisé pendant la phase G1 et le début de la phase S.

Un hétérotrimère formé d'une unité catalytique ayant une activité sérine-thréonine kinase (DNA-PKcs) et d'une unité régulatrice intervient dans cette voie de réparation. L'unité régulatrice, appelé hétérodimère Ku est formée de deux sous unités : Ku70 et Ku80. L'hétérodimère Ku forme une structure en anneau qui vient entourer les deux extrémités de la CDB (Walker et *al*., 2001). Une homologie de 2 à 4 bases est nécessaire entre les deux brins endommagés pour qu' « une synthèse par rebouchage des deux trous » soit effectuée. Il s'agit d'un mécanisme complexe imposant un alignement correct des deux extrémités qui peuvent être très distantes l'une de l'autre. La Figure 12 détaille les différentes étapes du mécanisme NHEJ. L'activation de la DNA-PK se fait en trois étapes : assemblage de Ku70 et Ku80, reconnaissance de la lésion et liaison du dimère à l'ADN et enfin recrutement et activation de DNA-PKcs.

La re-ligation par le NHEJ est donc liée à une « recombinaison illégitime » et peut s'accompagner de micro-insertions et de délétions importantes (fréquence ~ 25%). De nombreux travaux ont montré que la ligation des extrémités non homologues est généralement qualifiée de mécanisme infidèle de réparation et source de translocation chromosomique (Pfeiffer et *al*., 2000) (Figure 13).

Si plusieurs cassures « double brin » se produisent simultanément sur le génome et si celles-ci ont une localisation proche dans le noyau, le système NHEJ peut être pris en défaut. Les conséquences sont des inversions si les deux cassures siègent sur le même chromosome, des translocations si les cassures surviennent sur des chromosomes différents.

La fréquence des translocations impliquant l'oncogène *CMYC* et les gènes des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines suggère que la proximité spatiale de ces gènes dans le noyau des lymphocytes B serait un facteur « favorisant » dans la survenue d'un remaniement chromosomique participant à l'émergence d'un lymphome. Il faut noter que l'hétérodimère Ku est requis lors de la recombinaison V(D)J des gènes des immunoglobulines.

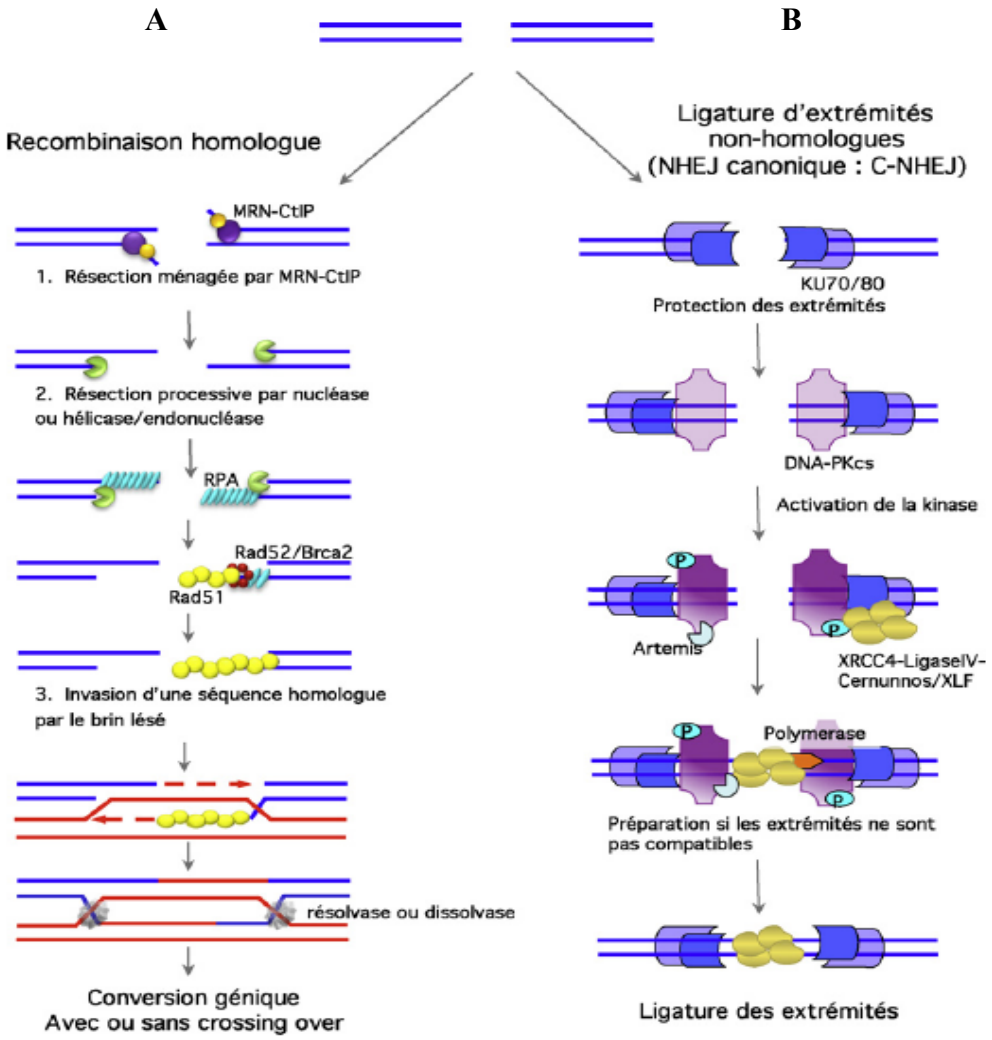


Figure 13. Réparation des cassures double-brin. La recombinaison homologue **(A)** utilise une séquence homologue intacte pour réparer la cassure double-brin, elle est initiée par une résection d'ADN simple-brin. Le modèle propose aujourd'hui que le complexe MRN, en association avec CtIP, initie la résection (étape 1), ce qui permet le recrutement d'autres nucléases (comme Exo1), responsables de la formation d'extrémités sortantes simple-brin (étape 2). Ces régions simple-brin sont couvertes par la protéine RPA. BRCA2 déplace RPA et charge la protéine Rad51. L'invasion du brin lésé de la séquence homologue est médiée par le filament d'ADN simple-brin couvert de Rad51 (étape 3). Selon le sens de résolution des intermédiaires par les résolvases, la conversion génique est associée ou non à un crossing-over. La ligature d'extrémité non-homologue (NHEJ) **(B)** ne nécessite pas d'homologie de séquence. Les extrémités d'ADN sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la sous-unité catalytique ADN-PKcs. L'activation de celle-ci permet le recrutement du complexe XRCC4/ADN ligase IV aidé par Cernunnos/XL-F. Une préparation des extrémités par la protéine Artémis et l'intervention de polymérases peuvent être nécessaires avant l'étape de ligature (Rass et *al*., 2011).

3. Les lymphomes « B »

En France, 95% des lymphomes sont d'origine cellulaire B (Kuppers et *al*., 2005). Il existe différents cancers de type B qui diffèrent selon le stade de développement des cellules B. C'est une prolifération monoclonale massive d'une cellule B qui est bloquée à un stade précis de maturation. La majorité des lymphomes B est mature et provient de cellules issues des centres germinatifs ou post-centres germinatifs. La plupart de ces lymphomes porte les stigmates de réarrangements chromosomiques accidentels (ou translocations). Les lymphomes B sont généralement liés à des facteurs environnementaux, immunitaires, les virus et maladies du tissu conjonctif.

Les processus d'excision suivis de remodelage de l'ADN, qui sont inhérents aux loci *IGH* et *IGL*, créent une forte instabilité, favorisant l'échange de matériel génétique avec d'autres chromosomes (Marculescu et *al*., 2006). Le locus *IGH*, remodelé tout au long du développement B, est donc une zone critique pour les évènements de translocations. Ils peuvent se produire aux trois moments clés de la maturation B : 1) pendant la recombinaison entre les segments géniques D et J ; 2) après la recombinaison, au cours de l'hypermutation somatique, au niveau des segments VDJ réarrangés ; 3) dans les régions de commutation de classe.

On distingue deux sous-groupes de lymphomes : le lymphome de Hodgkin et les lymphomes non-hodgkiniens (LMNH). Les LMNH sont divisés en deux groupes : les lymphomes T, issus de la lignée lymphoïde T (environ 30% des cas) (que nous n'aborderons pas) et les lymphomes B qui font l'objet du paragraphe suivant (environ 95% des cas).

3.1. Les lymphomes non hodgkiniens de type B

3.1.1. Définition

Les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) constituent un ensemble de proliférations lymphoïdes clonales atteignant les organes lymphoïdes, notamment les ganglions, mais pouvant également concerner des organes non lymphoïdes. Ces lymphomes sont, dans 85% des cas, d'origine lymphocytaire B. Bien que présentant des caractéristiques communes, ils regroupent un grand nombre d'entités différentes sur les plans clinique, anatomo-pathologique, immunologique, cytogénétique et moléculaire, cette hétérogénéité rendant compte de la complexité du système immunitaire, et la diversité des cellules

lymphoïdes dont ils sont issus. Les principes actuels de classifications reposent sur le concept d'un équivalent cellulaire normal à chaque type de LMNH et sur l'identification d'entités cliniques, histologiques et biologiques. La figure ci-dessous montre les contre-parties normales et pathologiques de l'origine cellulaire des LMNH B (Küppers).

La classification de l'OMS [WHO classification 2008] est devenue la référence. Il existe d'importantes disparités évolutives et pronostiques, certains lymphomes dits indolents, (le lymphome folliculaire par exemple) à évolution lente, à l'inverse des lymphomes dits agressifs dont fait partie le lymphome de Burkitt.

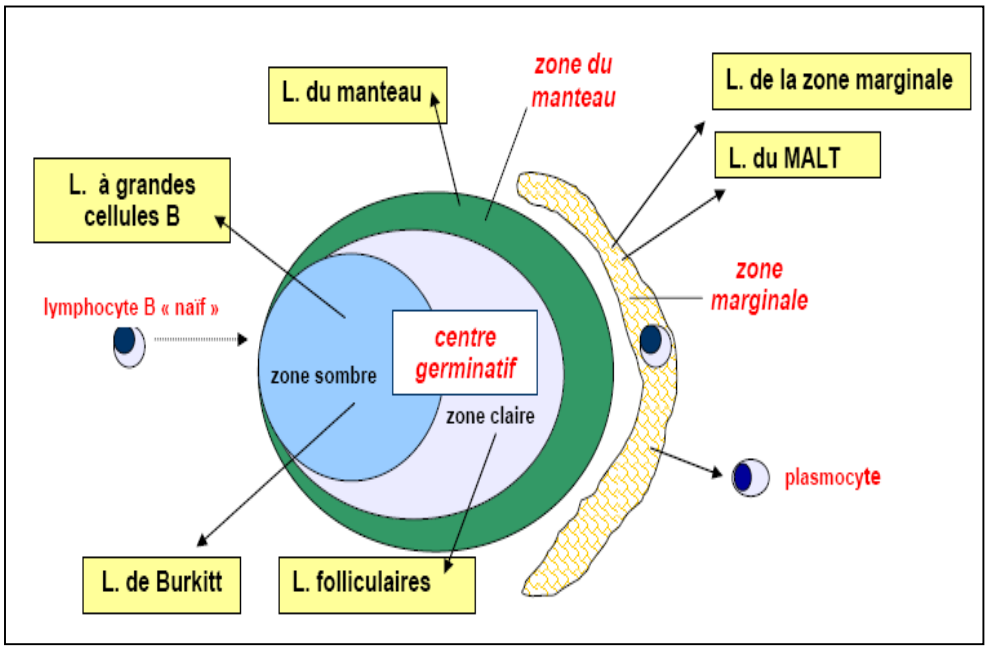


Figure 14. **Origine cellulaire des hémopathies lymphoïdes de type B** (Küppers).

3.2. Le Lymphome de Burkitt (BL)

Le Lymphome de Burkitt (BL) est une prolifération monoclonale de lymphocytes B décrite par Denis Burkitt en 1958. Considéré comme un lymphome de haut grade de malignité il représente 35% à 50% des LMNH de l'enfant et 2% des LMNH de l'adulte. Première pathologie maligne humaine dans laquelle le rôle étiologique du virus Epstein-Barr (EBV) a été démontré, cette maladie s'observe de façon endémique chez les enfants d'Afrique centrale et plus généralement au niveau des régions d'endémie palustre) et de façon sporadique dans les pays occidentaux où il représente la moitié des lymphomes de l'enfant.

3.2.1. Présentation clinique du Lymphome de Burkitt

Trois formes cliniques et épidémiologiques de BL sont aujourd'hui décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Brady et *al*., 2007).

Une forme endémique qui est retrouvée principalement en Afrique équatoriale et en Papouasie-Nouvelle Guinée, dans des zones où la malaria est endémique. Elle survient essentiellement chez les enfants de 4 à 7 ans. Elle est prédominante chez les garçons avec un ratio homme/femme de 2/1. Cette forme de LB est très fortement associée à EBV (98% des cas). Cliniquement, elle se manifeste par des tumeurs de la mâchoire mais également par des tumeurs de la cavité abdominale (reins, tractus gastro-intestinal et ovaires).

Une forme sporadique décrite dans le reste du monde et complètement indépendante des conditions climatiques et des zones géographiques. Elle représente 1 à 2% des lymphomes de l'adulte et plus de 40% des lymphomes de l'enfant aux USA et en Europe de l'ouest (Blum et *al*., 2004). Elle affecte majoritairement les jeunes hommes (ratio homme/femme de 2.3/1 aux Etats-Unis et de 3.7/1 en France). Elle est associée à EBV dans 15 à 20% des cas (Brady et *al*., 2007; Kelly and Rickinson, 2007). Cliniquement, cette forme de BL se traduit majoritairement par la présence de tumeurs abdominales (80% des cas).

Une forme associée au syndrome d'immunodéficience, survenant chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1). La fréquence des lymphomes malins non hodgkiniens (lymphome immunoblastique et BL) est fortement augmentée chez les sujets infectés par le virus VIH. Les causes de cette augmentation sont au moins liées au déficit immunitaire.

L'EBV est fortement associé au BL en Afrique tropicale mais seulement dans 10 % à 20 % des cas de BL survenant en Europe et aux Etats-Unis (Olweny CL et *al*., 1977). La présence de ces deux virus dans ce type de lymphome n'est pas un simple hasard. Il existe une relation épidémiologique entre la survenue du BL et l'infection virale. Les virus EBV et VIH-1 peuvent interagir avec les lymphocytes B. Ils sont capables de stimuler et activer les lymphocytes B mais le rôle précis de ces virus dans la transformation lymphocytaire reste imparfaitement compris.

3.2.2. Histologie et biologie

Le BL est caractérisé par la présence de cellules tumorales rondes, parfois ovales, de taille variable (12 à 25 μm). Les noyaux sont arrondis et présentent deux à cinq nucléoles, entourés d'une fine couronne de cytoplasme contenant de nombreuses vacuoles lipidiques (Harris et *al*., 1994; Minowada et *al*., 1967). Cette tumeur est caractérisée par un taux de prolifération cellulaire très élevé ainsi qu'un nombre important de cellules apoptotiques. Des macrophages infiltrant, uniformément dispersés, sont également observés au sein de la tumeur, lui donnant ainsi un aspect de « ciel étoilé » (Figure 15).

Les cellules de LB expriment plusieurs antigènes de différenciation des lymphocytes de la lignée B tels que CD19, CD20, CD22 et CD40. La très grande majorité de ces cellules expriment une IgM de surface mais l'expression d'une IgG a toutefois été observée dans certains cas (Gunven et *al*., 1980; Klein et *al*., 1968). Le profil immunophénotypique du BL est le suivant, il a comme point de départ le centre germinatif des cellules B et présente généralement le profil suivant (centre germinatif): CD20+, CD10+, Bcl-6+ avec Bcl-2 et TdT négatifs. Les cellules tumorales montrent une très forte activité proliférative de près de 100%.

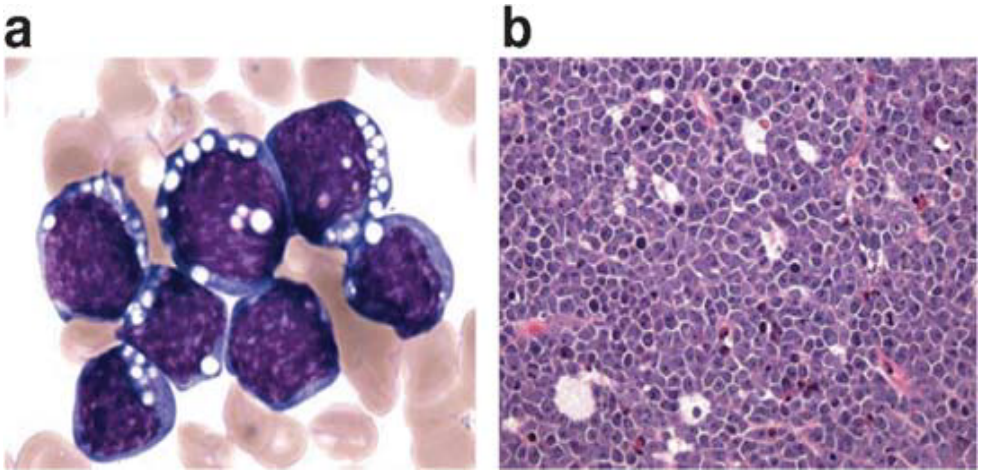


Figure 15. Cytologie d'un lymphome de Burkitt (Kutok and Wang, 2006).

3.2.3. Profil génétique du BL

Le BL est caractérisé par la translocation du gène *CMYC*. Dans 80% des cas, *CMYC* est transloqué à proximité du locus *IGH* t(8 ;14) (Figure16) et dans 20% des cas à proximité du locus IgL, de la chaîne κ (t(2 ;8)) ou de a chaîne λ (t(8 ;22)).

Les points de cassures dans les BL sont définis en trois classes selon leur localisation par rapport au gène *CMYC* (Figure17). Pour la classe I, le point de cassure intervient dans le gène *CMYC*, soit dans l'exon 1, soit dans le premier intron, la région codante restant intacte. Pour la classe II, le point de cassure est situé quelques Kb en 5' de l'exon 1. Pour ces deux classes, le point de cassure sur le locus *IGH* intervient dans les régions Sμ et il est associé aux BL sporadiques et aux BL associés au (SIDA). Enfin pour la classe III, le point de cassure sur le chromosome 8 a lieu au moins 100Kb en amont du gène *CMYC* et se produit dans les régions VDJ sur le locus *IGH*. La classe III est associée aux BL endémiques.

Deux types de réarrangements sont obtenus. Dans le cas de BL endémiques, les trois exons du gène *CMYC* ainsi que ces promoteurs P1, P2 et P3 sont conservés ; sur le locus *IGH*, les régions régulatrices Eμ et la LCR 3'IGH également. En ce qui concerne les deux autres types de BL, la translocation ne concerne que la partie codante de *CMYC* et son promoteur P3 ; au niveau du locus *IGH,* seule reste la région régulatrice en 3', Eμ ayant été délété.

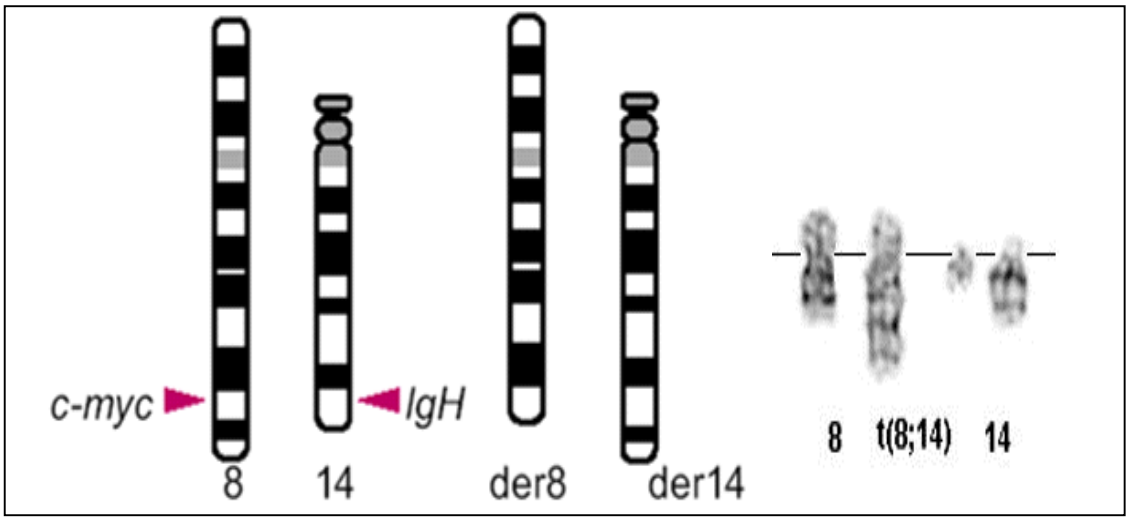


Figure 16. Les réarrangements génétiques dans le lymphome de Burkitt (Huret et *al*., 2004).

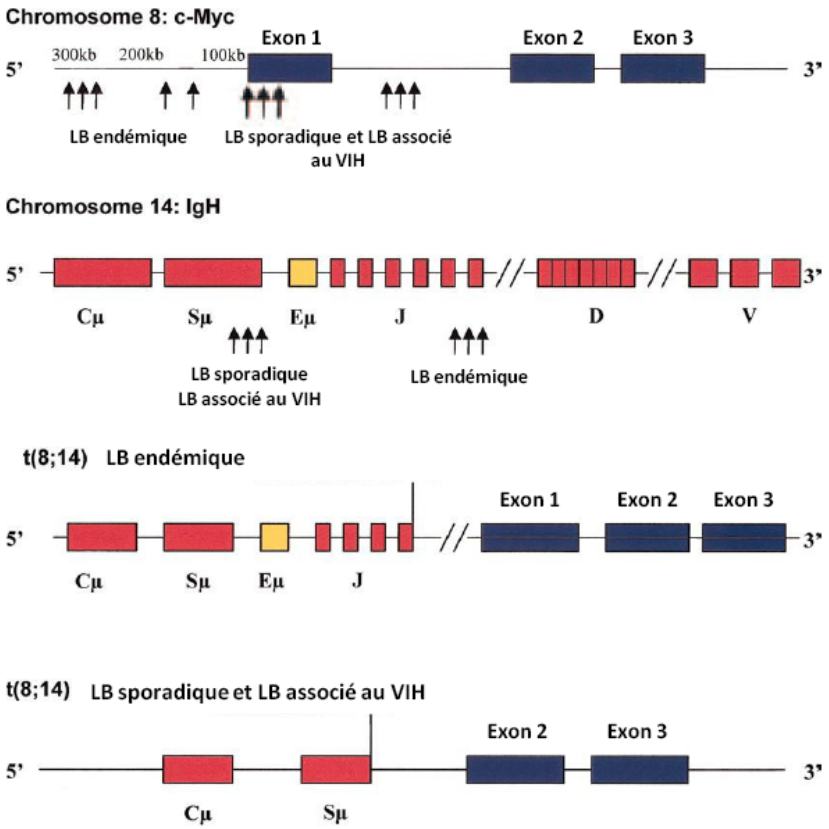


Figure 17. Localisation des points de cassure sur le gène *CMYC* et sur le locus *IGH* lors du lymphome de Burkitt chez l'homme (Blum et *al*., 2004).

3.2.4. *CMYC* et Lymphome de Burkitt

Le gène *CMYC* a été l'un des premiers oncogènes reconnus en pathologie tumorale chez l'homme.

3.2.4.1. Rôle physiologique de *CMYC*

CMYC joue un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, le métabolisme et l'apoptose. Les souris « knock-out » pour cMyc meurent au stade embryonnaire 9,5 - 10,5 jours suite à diverses anomalies dans le développement de l'embryon (Davis and Bradley, 1993). *CMYC* régule de nombreuses fonctions biologiques. Elles sont fortement perturbées lorsque l'expression de *CMYC* est dérégulée (Vita and Henriksson, 2006) (Figure17).

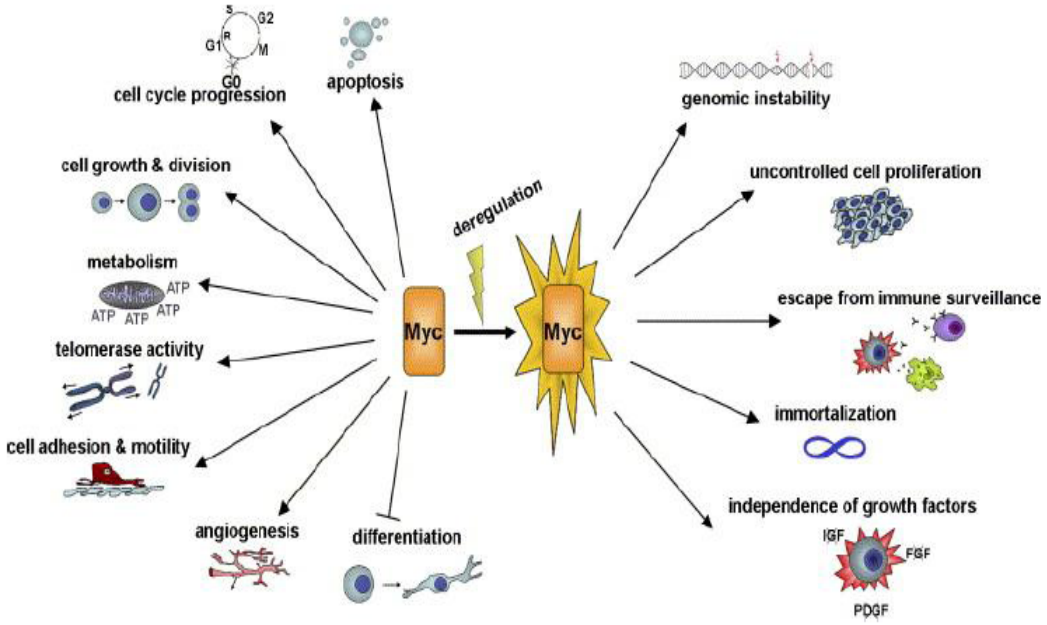


Figure 18. Fonctions biologiques contrôlées par *CMYC* dans des conditions normales et durant la lymphomagenèse (Vita and Henriksson, 2006).

3.2.4.2. Fonction de la protéine CMYC

La protéine CMYC forme un complexe hétérodimérique avec la protéine Max grâce à son domaine LZ. Ce complexe Myc-Max est capable de se lier à l'ADN au niveau de la boîte CACGTG (E box), ce qui induit l'activation ou la répression du gène cible. En revanche, la protéine Mad régule négativement CMYC en formant un hétérodimère avec Max.

La protéine CMYC est exprimée dès l'embryogenèse de façon ubiquitaire jusque dans les tissus adultes. Elle joue un rôle majeur dans le développement en intervenant dans le processus de très nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, le métabolisme et l'apoptose (Dang et *al*., 1999; Vita and Henriksson, 2006).

3.2.4.3. Dérégulation du gène *CMYC* par les activateurs du locus *IGH*

Le gène *CMYC* fut découvert pour la première fois chez des patients atteints du BL. Le BL chez l'homme, le plasmocytome chez la souris et l'immunocytome chez le rat sont

invariablement associés à une translocation de *CMYC* au niveau d'un des trois loci codant les immunoglobulines. La translocation affecte majoritairement le locus *IGH* codant les chaînes lourdes (80% des cas chez l'homme) (cf. Tableau 1).

La translocation chromosomique fut le premier facteur responsable de la dérégulation de *CMYC,* chez l'homme*,* impliquant systématiquement la région 8q24 du chromosome 8 et, soit la région q32 du chromosome 14 (dans 80% des cas), soit la région p11 du chromosome 2 (15% des cas), soit la région q11 du chromosome 2 (5% des cas) chez l'homme. Ces translocations sont responsables de la sur-expression de *CMYC*, la stimulation de la prolifération des cellules et le développement d'un BL.

La translocation du gène *CMYC* avec l'un de ces partenaires est responsable de la dérégulation de *CMYC* dans les BL par juxtaposition de la région codante de *CMYC* à des régions enhancers des gènes d'immunoglobulines. Ces régions enhancers ont une fonction transactivatrice, sur des gènes situés jusqu'à une distance de 500kb. La résultante de l'activité physiologique de ces enhancers dans les lymphocytes B (impliqués dans la genèse des immunoglobulines) est l'existence d'un taux élevé de la protéine CMYC dans les tumeurs présentant ces translocations. Il a été montré que la construction d'un transgène fusionnant les régions codantes de *CMYC* sous la dépendance de l'enhancer Em *IGH* était responsable d'une expansion polyclonale de précurseurs lymphoïdes B, associée à un déficit de cellules B matures. Les souris portant ce transgène développent dans 30% des cas un lymphome durant leurs 100 premiers jours de vie.

Le rôle de *CMYC* dans la régulation du cycle cellulaire est complexe. Dans un modèle de knock-out de *CMYC*, ont été observés un allongement net de la durée des phases G1 et G2 du cycle, ainsi qu'une diminution nette des protéines kinases cycline D1/CDK4 et CDK6 ayant un effet promoteur sur le cycle cellulaire. Cette prolifération anormale est aussi associée à un blocage de différenciation cellulaire, dans lequel *CMYC* joue aussi un rôle essentiel.

Pathologie et espèce	Translocation	Réarrangement	Fréquence
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(8 ;14)	Myc-IgH	80%
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(2 ;8)	Myc-Igκ	15%
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(8 ;22)	Myc-Igλ	5%
Plasmocytome (Souris)	T(12 ;15)	Myc-IgH	90%
Plasmocytome (Souris)	T(6 ;15)	Myc-Igκ	10%
Plasmocytome (Souris)	T(15 ;16)	Myc-Igλ	<1%
Immunocytome (Rat)	T(6 ;7)	Myc-IgH	100%

Tableau 1. Translocations chromosomiques dérégulant CMYC chez trois espèces de mammifères.

3.3. Virus et Lymphomagenèse

Les premières associations suggérées entre agent pathogène et cancer datent du XVIII siècle. Un certain nombre de virus est incriminé dans la pathogénie des Lymphomes Malins Non- Hodgkiniens (LMNH). Ceux-ci ne sont cependant pas considérés comme les seuls facteurs responsables de la lymphomagenèse. Le BL est associé à l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) en Afrique et à l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) en Europe de l'Ouest et USA. On sait cependant que les personnes dont les défenses immunitaires sont affaiblies (après un traitement ou lors de différentes maladies) ont un plus fort risque de développer un lymphome. Certains virus peuvent aussi favoriser l'apparition d'un lymphome par des mécanismes directes (transformation des lymphocytes par un virus, interaction des protéines viraux avec les protéines cibles des lymphocytes, etc.) et indirectes (comme l'immunodéficience induite par le VIH).

De plus, certains virus, après avoir infecté leur hôte de façon parfois asymptomatique, persistent dans l'organisme de manière silencieuse sous forme latente persistante puis sont réactivés, devenant à nouveau pathogènes le plus souvent du fait de l'intrication de plusieurs

facteurs favorisants: 1) un déficit immunitaire, qu'il soit secondaire à l'infection virale et/ou préexistant, primitif ou acquis (exemple du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou innée), 2) l'action de l'agent infectieux sur le compartiment lymphocytaire, de façon soit directe (effet transformant d'oncoprotéines virales), soit indirecte (prolifération polyclonale de lymphocytes B favorisant l'émergence secondaire d'une population B clonale transformée).

Associer, sur le plan épidémiologique, un agent pathogène et un cancer reste complexe. Des associations comme papillomavirus (HPV) et cancer du col de l'utérus, virus de l'hépatite B et carcinome hépatocellulaire sont connues comme l'implication des rétrovirus comme le VIH associé au Sida et au LMNH viro-induit et le virus Epstein Barr (EBV) associé au BL. Cependant d'autres facteurs interviennent dans la cancérogénèse comme le mode de vie, la localisation géographique, le niveau socio-économique et l'environnement.

Pour comprendre la résurgence de ces pathologies liées à la réactivation virale, il est indispensable de comprendre comment ces virus, au demeurant silencieux, finissent par échapper aux contraintes mises en place par l'hôte pour les empêcher de se manifester. Contrairement à la réponse cytoplasmique, la réponse nucléaire qui régule l'infection des virus précités est relativement mal connue.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des virus EBV et VIH-1 dans l'émergence d'un BL.

3.3.1. Le Virus d'Epstein-Barr (EBV)

L'histoire de la découverte du virus d'Epstein-Barr (EBV) remonte à 1958, quand le chirurgien britannique Denis Burkitt, a décrit des cas de lymphomes à localisation maxillaire chez les enfants d'Afrique de l'Est. Il a remarqué que ce type de lymphome était plus fréquent dans les régions d'Afrique équatoriale où sévit le paludisme. Devant ces données épidémiologiques et cliniques, D. Burkitt a suggéré que l'étiologie de ces lymphomes serait infectieuse. Six ans plus tard, en 1964, le virus a été découvert par l'analyse d'une biopsie d'un spécimen de tumeur en microscopie électronique et nommé ainsi en l'honneur de Michael Anthony Epstein et de son étudiante Yvonne Barr. En 1968, le Dr Henle et son équipe de recherche établirent un lien entre la mononucléose infectieuse et l'EBV. Ils

observèrent qu'une technicienne du laboratoire présentait une mononucléose infectieuse ainsi qu'une séroconversion vis-à-vis du virus.

L'EBV est un puissant inducteur *in vitro* de l'immortalisation et de la transformation des lymphocytes B, permettant l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) (Liebowitz et *al*., 1992). L'inoculation des LCLs chez la souris SCID conduit au développement de tumeurs dont les caractéristiques morphologiques se rapprochent des lymphoprolifération polyclonales B des immunodéprimés (Menin et *al*., 1996). Dans ces modèles cellulaires, le virus est majoritairement à l'état latent. En revanche, dans 2 à 5% des cellules, le virus peut entrer spontanément en cycle réplicatif. Chez les sujets immunodéprimés (HIV, endémie paludique, transplantés), le virus induit une intense prolifération polyclonale des lymphocytes B infectés, une augmentation de recombinaisons VDJ et ainsi le risque de survenue de translocations chromosomiques comme la translocation t(8;14), juxtaposant *CMYC* (proto-oncogène) et les gènes des immunoglobulines dans le cadre du BL. Le rôle favorisant de l'EBV dans la progression tumorale a été suggéré (Arbach et *al*., 2006).

3.3.1.1. Structure du virus EBV

L'EBV appartient à la famille des Herpesviridae, faisant partie de la sous-famille des Gamma herpes virinae et au genre des lymphocryptovirus. C'est un virus sphérique de 120 à 200 nm de diamètre, composé d'une enveloppe lipidique d'origine cellulaire porteuse de spicules glycoprotéiques, tapissée sur sa face interne d'une couche protéique amorphe, le tégument. En plus de l'enveloppe, le virus est constitué du tégument qui correspond à une structure protéique fibreuse, d'une capside protéique icosaédrique d'environ 100 nm de diamètre qui comprend 162 capsomères et d'un « core » qui correspond à la structure contenant le génome viral.

L'enveloppe, contient un nombre de glycoprotéines virales variable d'un virus à l'autre. L'EBV présente à sa surface plusieurs glycoprotéines d'enveloppe dont le gp350/220 qui interagissent avec les lymphocytes B via leurs récepteurs CD21, les gp 85/25 et le gp 42 nécessaires à l'infection.

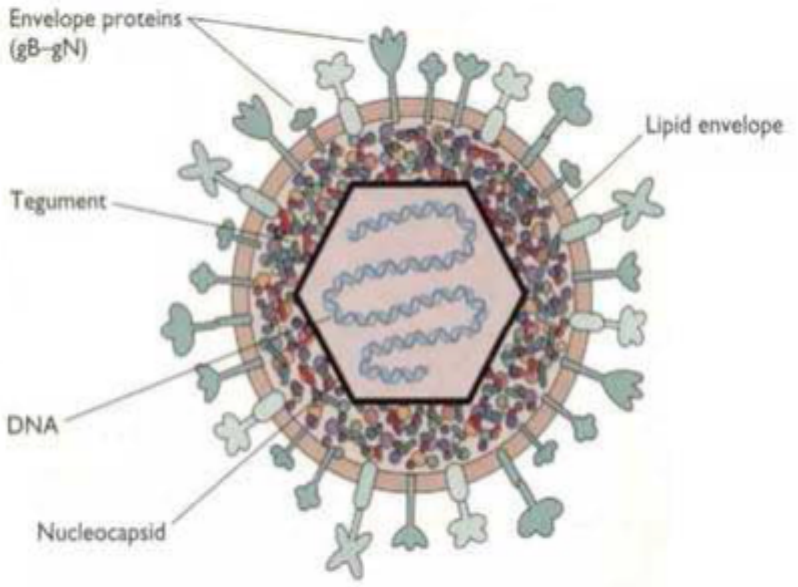


Figure 19 : Représentation du virus d'Epstein-Barr.

Le génome viral de l'EBV est constitué d'un ADN double brin, sous forme linéaire et composé d'environ 172Kb. Dans la cellule infectée, le génome viral est dans la majorité des cas, sous forme épisomale et rarement intégré (Rickinson et *al*., 1996). En 1984, le génome de l'EBV a été entièrement séquencé à partir de la souche B95-8 de marmouset infecté par l'EBV en primo-infection (Baer et al., 1984). Des répétitions internes en tandem, « internal repeat » (IR1) s'intercalent entre deux régions uniques : « unique short » (US) et « unique long » (UL).

Une centaine de gènes ont été décrits, dont au moins onze sont exprimés pendant la phase de latence. Ces gènes sont regroupés en 3 principales familles: six gènes nucléaires, deux gènes LMP, des gènes codant pour des petits ARNs (EBER) (cf. Tableau 2).

- les 6 gènes qui codent pour EBNA (Epstein-Barr virus Nuclear Antigen):

- EBNA-1 est requis pour la réplication épisomale et la maintenance du génome viral.

- EBNA-2 est essentiel au processus d'immortalisation des lymphocytes B et à l'expression des protéines EBNA-1 et EBNA-3. La variation d'expression des protéines EBNA-2 induit les variations biologiques les plus significatives entre deux types de virus Epstein-Barr. EBNA2 est un facteur de transcription qui stimule l'expression des LMPs, des EBNAs (transcrits à partir du promoteur Cp) et d'un certain nombre de protéines cellulaires comme

CD21 (récepteur de l'EBV) et CD23 (marqueurs d'activation des lymphocytes B) (Laux et *al*., 1994).

- EBNA-3 est constitué d'une famille de 3 gènes de haut poids moléculaire localisés en tandem sur le génome du virus Epstein-Barr : EBNA3A (ou EBNA3), EBNA3B (ou EBNA4) et EBNA3C (ou EBNA6). Il régule négativement la transactivation des gènes par EBNA2. EBNA3A et EBNA3C, essentiels à la transformation des cellules B *in vitro* (Tomkinson et *al*., 1993).

- EBNA-LP (ou EBNA-5) code pour un ensemble de protéines extrêmement polymorphiques. Sa fonction est mal connue.

- les 2 gènes qui codent pour LMP (latent membrane protein)

- LMP-1 est exprimé en absence d'EBNA-2 pendant l'activation du cycle lytique des lymphocytes B. Cette protéine protège de l'apoptose les lymphocytes B infectés (activation de l'oncogène *BCL2*). De plus, l'action de transformation de LMP-1 semble impliquer les protéines de signalisation de TRAF (tumor necrosis Factor receptor-associated factors).

- LMP-2 code pour une protéine de membrane contenant 12 domaines transmembranaires hydrophobiques. Elle est colocalisée avec LMP-1 au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes infectés.

- les gènes qui codent les petits ARNs EBER (EBV Encoded RNA) et BART (BamHI-A Rightward Transcripts)

- **EBER-1 et EBER-2** sont les ARNs de l'EBV quantitativement les plus abondants durant la phase de latence des cellules B infectées. Ces petits ARNs sont codés sous forme non polyadénylée. La majorité des EBERs sont localisés dans le noyau et où ils forment un complexe avec la protéine La. La protéine La est une protéine ubiquitaire dans les cellules eucaryotes et est associé à l'extrémité 3' terminal des nouveaux ARN synthétisés.

L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation d'EBV en influençant la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

Table 1. Latent EBV-encoded genes

EBV-encoded genes	Location	Latency type
EBNA-1	Nucleus	I, II, III
EBNA-2	Nucleus	III
EBNA-3	Nucleus	III
LMP-1	Membrane	II, III
LMP-2	Membrane	II, III
EBER-1 and *EBER-2*	Nucleus	I, II, III

Abbreviations: EBV, Epstein–Barr virus; EBNA, Epstein–Barr nuclear antigen; LMP, latent membrane protein; EBER, Epstein–Barr RNA.

Tableau 2: Les gènes nucléaires codés par l'EBV (Carbone et *al*., 2008) The official journal of the society for translational oncology.

3.3.1.2. Cycle biologique de l'EBV

En rappel, le cycle biologique du virus *in vivo* se déroule comme suit : primo-infection, latence, réactivation.

La transmission du virus est essentiellement salivaire (maladie du baiser) mais aussi par l'intermédiaire des sécrétions génitales, transfusions sanguines voire lors de greffe d'organe. Le virus infecte transitoirement les cellules épithéliales. Les lymphocytes B vont être infectés au contact des cellules épithéliales qui produisent du virus et prolifèrent (stade de prolifération). Ils rentrent dans la circulation générale et permettent la dissémination du virus dans l'organisme.

La majorité des lymphocytes B infectés (99%) vont devenir des lymphocytes mémoire n'exprimant aucune protéine virale (latence 0), 1% entrent en phase de latence II ou en cycle lytique avec une faible production virale.

Nous ne détaillerons que les cellules cibles impliquées lors de la primo-infection mais ne détaillerons pas les étapes de latence et réactivation (données non contributives pour la compréhension de notre travail).

3.3.1.2.2. Les voies de contamination

La transmission de l'EBV se fait essentiellement par contact direct avec la salive (Figure 20). Ce mode de transmission peut expliquer le caractère ubiquitaire et précoce de l'infection par l'EBV: 100% des enfants sont infectés avant l'âge de deux ans en Afrique intertropicale alors que dans les pays développés, l'infection peut survenir dans l'adolescence ou encore à l'âge adulte (Henle and Henle, 1968). Des contaminations par transfusion sanguine (Turner et *al*., 1972), voies sexuelles (Portnoy et *al*., 1984) ou lors de transplantations d'organes ont été rapportées. La présence de l'EBV dans le lait maternel a également était constaté (Junker et *al*., 1991).

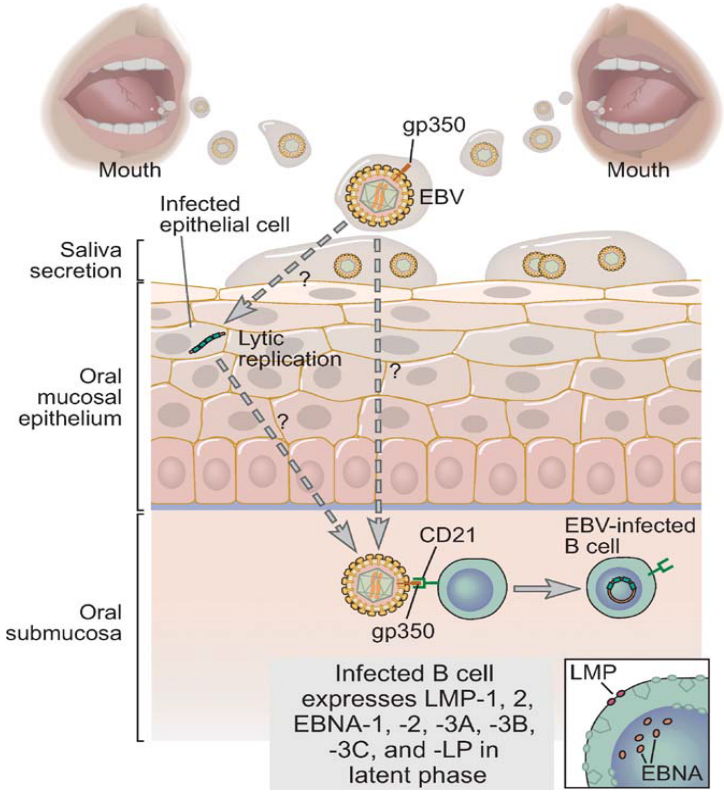


Figure 20. Les étapes précoces d'une infection par EBV. Après contact entre individus infectés, le virus pénètre dans la cavité buccale.

3.3.1.2.2. Les cellules cibles de l'EBV

Les organes cibles de la primo-infection semblent être majoritairement localisés dans la zone oropharyngée. La présence de lymphocyte B et de cellules épithéliales infectées a été montrée dans cette zone (Kobayashi et *al*., 1998). Au cours de la primo-infection, des lymphocytes B circulants infectés apparaissent très tôt. Leur nombre augmente rapidement puis diminue jusqu'à un taux de 1 à 60 lymphocytes B infectés sur un million (Steven, 1997). Les principales cellules cibles du virus lors de la primo-infection semblent donc être les cellules épithéliales de l'oropharynx et les lymphocytes B. L'EBV est capable d'infecter des cellules « non conventionnelles » incluant les lymphocytes T, les cellules NK et les monocytes.

a- Les cellules épithéliales

Outre les pathologies malignes lymphoïdes, l'EBV est associé à des cancers épithéliaux, comme le carcinome du rhinopharynx (CRP) ou le carcinome gastrique (Dolcetti and Menezes, 2003), suggérant son tropisme pour ce type cellulaire.

In vivo, l'EBV infecte les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales. Néanmoins, le fait que leur infection ait lieu précédemment ou subséquemment à celle des lymphocytes B est une question encore débattue dans la littérature (Chang et *al*., 1999; Hadinoto et *al*., 2009; Pegtel et *al*., 2004; Shannon-Lowe et *al*., 2006). En revanche, lorsque l'infection a lieu, l'EBV y effectue un cycle réplicatif qui induit la destruction de ces cellules. L'infection de ce type cellulaire est moins bien comprise que celle des lymphocytes B car, contrairement aux lymphocytes B, les cellules épithéliales n'expriment pas le récepteur CD21 (Speck et *al*., 2000). Cependant, différentes équipes ont réussi à infecter efficacement des cellules épithéliales en les co-cultivant avec des LCLs suggérant que des contacts directs entre ces deux types cellulaires pourraient permettre l'entrée du virus dans des cellules malgré l'absence du CD21 (Chang et *al*., 1999; Imai et *al*., 1998; Speck and Longnecker, 2000; Yoshiyama et *al*., 1997). Trois voies d'entrée du virus ont été décrites.

Une étude *in vitro* a montré que des immunoglobulines A (IgA) dirigées contre la gp350/220 de l'EBV favorisent l'infection des cellules épithéliales par un mécanisme d'endocytose du complexe IgA-EBV (Sixbey and Yao, 1992). En absence du CD21, L'EBV peut s'attacher aux cellules épithéliales grâce à ses protéines gH et gL et aux intégrines présentes à la surface

des cellules (Borza et *al*., 2004; Chesnokova et *al*., 2009). Les virions produits par des LCLs possèdent peu de gp42 à leur surface, augmentant leur tropisme pour les cellules épithéliales. A l'inverse, les virions produits par les cellules épithéliales possèdent un plus grand nombre de gp42 qui interagiront avec le CMH de classe II des lymphocytes B (Figure 21).

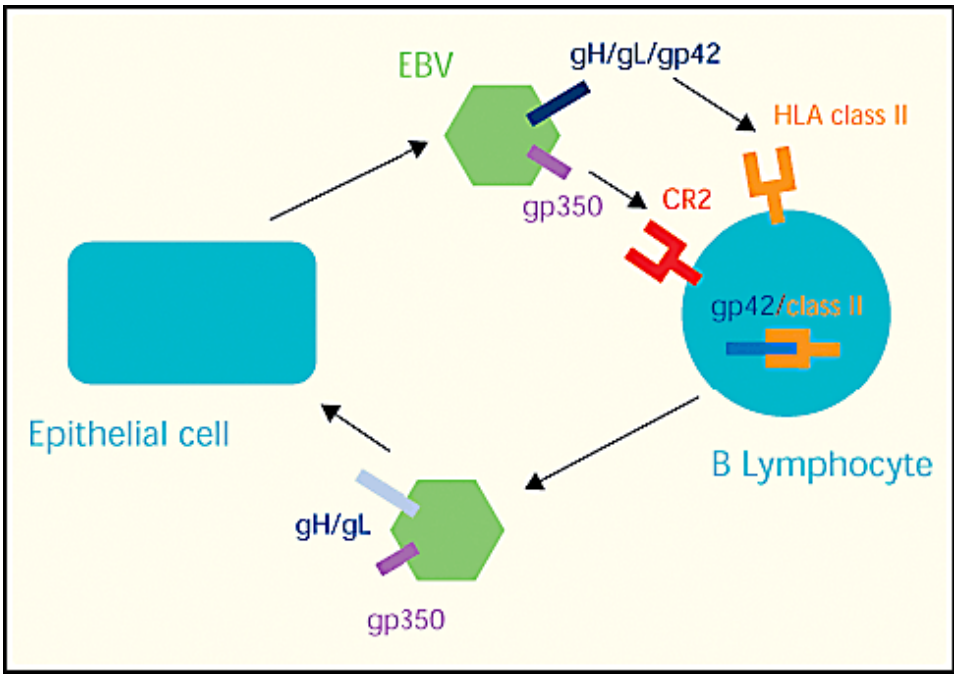


Figure 21. Modèle de l'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV (Farrell, 2002).

L'EBV infecte les lymphocytes B par interaction entre la gp350 et le CD21 (CR2) puis entre le complexe gH/gL/gp42 et le CMH de classe II. Les virions produits par la LCL sont dépourvus de la gp42 qui est séquestrée par le CMH II et peuvent infecter les cellules épithéliales grâce à l'interaction du complexe gH/gL et de son récepteur. Les virions produits par la réplication virale dans les cellules épithéliales expriment de hauts niveaux de gp42 et peuvent donc infecter d'autres lymphocytes B (Farrell, 2002).

Enfin, plus récemment, il a été décrit un processus par lequel l'EBV utilise les lymphocytes B comme transporteur pour ensuite infecter les cellules épithéliales. Ce processus se déroule en 3 étapes : (i) fixation de virions de l'EBV à la surface des lymphocytes B grâce à l'interaction gp350/CD21, (ii) formation d'une synapse intercellulaire entre lymphocytes B et cellules

épithéliale, (iii) fusion et absorption du virus par les cellules épithéliales (Shannon-Lowe et *al*., 2006). Ce mécanisme d'infection se déroule au niveau des surfaces basolatérales des cellules épithéliales et nécessite CD11b à la surface des lymphocytes B et CD44v3 (CD44 variant 3) ainsi que LEEP-CAM (Lymphocyte-Endothelial-Epithelial Cell Adhesion Molecule) à la surface basolatérale des cellules épithéliales (Shannon-Lowe and Rowe).

b- Les lymphocytes B

Le lymphocyte B reste la cellule hôte majoritaire du virus EBV. L'EBV a un tropisme privilégié pour le lymphocyte B. En effet, ce type cellulaire peut facilement être infecté par l'EBV *in vitro* (Kieff et Rickinson., 2007). De plus, il exprime fortement le principal récepteur du virus, CD21, ainsi que le corécepteur, CMH de classe II.

- **Infection des lymphocytes B par l'EBV**

Pour infecter des lymphocytes B *in vitro*, l'EBV utilise le récepteur cellulaire, CR2 ou CD21, qui appartient à la super famille des immunoglobulines et qui fixe le fragment C3d du complément (Frade et *al*., 1985). La pénétration du virus à l'intérieur des lymphocytes B se fait par interaction entre la glycoprotéine gp 350/220 sur le virus et la protéine de surface CD21 chez le lymphocyte (Tanner et *al*., 1987). D'autres glycoprotéines virales, gp 25, gp 85 et gp 42 forment un complexe nécessaire à la pénétration du virus dans la cellule. La protéine gp 42 se lie aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) et est nécessaire à la fusion du virus avec la membrane cellulaire du lymphocyte (Haan et *al*., 2000). Le virus pénètre ensuite par endocytose dans la cellule.

La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme ou elle interagit avec le cytosquelette. Le génome viral entre dans le noyau ou il se circularise. Rapidement, le promoteur Wp permet l'expression des protéines EBNA2 et EBNA-LP (4 heures après l'infection). En effet, ce promoteur contient un enhancer spécifique des cellules lymphoïdes et ne nécessite pas de protéines virales en trans pour fonctionner. Quelques heures plus tard (environ 12 heures après l'infection), l'ensemble des protéines EBNA3 et l'oncogène majeur d'EBV, la protéine LMP1, sont exprimés. Puis, 20 heures après le début de l'infection, quelques génomes viraux se circularisent. Les génomes viraux linéaires ne seront pas répliqués et disparaîtront au fil des divisions cellulaires, alors que l'ADN circularisé sera répliqué en même temps que les

chromosomes cellulaires au cours de la phase S. A ce moment là, toutes les protéines EBNA et la protéine LMP1sont exprimées, ce qui complète le processus d'immortalisation.

c- Les cellules cibles non conventionnelles

D'autres types cellulaires sont décrits comme cibles potentielles de l'EBV à savoir les lymphocytes T, les cellules Natural Killer (NK) et les monocytes. Contrairement aux lymphocytes T et aux cellules NK, aucune tumeur monocytaire associée à l'EBV n'a été décrite. D'autres cellules cibles ont été rapportées comme les polynucléaires neutrophiles (Larochelle et *al*., 1998), les cellules dendritiques folliculaires (Lindhout et *al*., 1994) et les astrocytes (Menet et *al*., 1999).

3.3.1.3. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr

L'EBV est associé à un très large spectre de pathologies bénignes et malignes. L'expression des protéines virales dans les tissus infectés conduisent à des altérations cellulaires qui contribuent à ces pathologies. Cependant la question qui se pose concerne le rôle joué par le virus (i) déclenchant, (ii) facilitant ou (iii) un simple passager dans ces pathologies ?

3.3.1.3.1 Primo-infection et mononucléose infectieuse

L'EBV est présent à l'état latent, de manière endémique, dans toutes les populations humaines: environ 90 % des individus adultes présentent des anticorps contre ce virus. La primo-infection par l'EBV a lieu généralement pendant l'enfance, le plus souvent asymptomatique. L'infection par l'EBV est d'autant plus précoce que les conditions d'hygiène sont précaires. En revanche, environ un tiers des adolescents développent une MNI lors de leur premier contact avec l'EBV (Godshall and Kirchner, 2000). La MNI survient majoritairement chez l'adolescent ou le jeune adulte entre 16 et 25 ans, avec une période d'incubation de 30 à 50 jours. C'est une maladie caractérisée par une prolifération polyclonale de lymphocytes B infectés suivie de l'apparition de grandes cellules T cytotoxiques spécifiques de l'EBV. La relation entre la MNI et l'infection par l'EBV, découverte fortuitement en 1967 (Henle and Henle, 1969), a été confirmée en 1974 (Epstein and Achong, 1977).

3.3.1.3.2. EBV et lymphoprolifération

EBV est un virus lymphotrope et épithéliotrope potentiellement oncogène comme l'ont démontrés de nombreuses publications (Naher and Petzoldt, 1992) et en particulier celles concernant le BL, le lymphome hodgkinien et le carcinome du rhinopharynx, le développement de lymphomes B humains chez les sujets immunodéprimés.

Le rôle de l'EBV dans le développement des tumeurs épithéliales est connu: les exemples sont une leucoplasie orale chevelue qui atteint les sujets immunodéprimés (SIDA, transplantés), le carcinome de nasopharynx (CNP) de type lymphoépithélial endémique en Asie du Sud-est, en Afrique du Nord et chez les esquimaux du Groenland, mais rare en Europe. Il induit une activation polyclonale des lymphocytes B et participe à la pathogénèse des lymphomes de type Burkitt.

a- Activation polyclonale des lymphocytes B

La fixation de l'EBV sur son récepteur induit l'activation du lymphocyte B qui devient transcriptionnellement compétent. L'activation des lymphocytes B augmente le risque des accidents au moment du remaniement VDJ des gènes *IGH*. L'EBV est considéré comme un puissant «mitogène B» (Rickinson and Lane, 2000). En effet, on l'utilise pour induire l'immortalisation des lymphocytes B. Après internalisation, le virus induit l'expression de protéines virales de latence dont la protéine LMP1 qui est exprimée à la surface des lymphocytes B infectés, transduit un signal d'activation, de prolifération et de survie. Le lymphocyte B infecté prolifère puis donne des cellules « réservoir » qui exprime la protéine virale LMP2a et persiste ainsi à vie dans l'organisme sous forme latente.

b- Rôle de l'EBV dans les Lymphomes de Burkitt

La découverte de l'EBV est intimement liée au BL puisque c'est grâce à une lignée Burkitt que le virus a été isolé. Le rôle de l'EBV est sans doute majeur dans la forme endémique de la maladie (présence identifiée dans 98% des cas) mais non dans la forme sporadique ou chez les patients infectés par le VIH (présence identifiée dans 30 à 40% des lymphomes) (Rickinson et Kieff., 2001).

Trois évènements paraissent importants pour la pathogénie du BL endémique : un état immunitaire lié au paludisme, un accident chromosomique (la translocation) et une primo-

infection précoce par l'EBV (avant trois ans) (modèle de LENOIR - O'CONOR, OLWENY - janvier 1985 Burkitt's lymphoma: a human cancer model). Le potentiel oncogène de l'EBV dans cette pathologie a pu être mis en évidence également *in vitro*. A partir de la lignée cellulaire EBV positive Akata, dérivée d'un BL, des cellules EBV négatives ont été isolées (Shimizu et *al*., 1996). Ces cellules non infectées ont perdu certaines caractéristiques telles que la tumorogénicité chez la souris SCID et sont moins résistantes à l'apoptose (Komano et *al*., 1998). Ces propriétés ont été restituées après réinfection par l'EBV démontrant ainsi son rôle d'oncogène (Sheng et *al*., 2003).

Le rôle de l'EBV dans l'oncogenèse des BL n'est pas encore clairement élucidé. On pense que la translocation observée [t(8;14)(q24;q32)] est le résultat accidentel d'une multiplication intense et prolongée des lymphocytes B sous l'influence du génome viral. EBV pourrait agir tôt dans le processus lymphomateux en augmentant la fréquence de l'instabilité génomique à l'intérieur des lymphocytes B infectés, augmentant ainsi la probabilité d'apparition d'une translocation impliquant CMYC.

La possibilité que l'EBV joue un rôle dans l'inhibition de l'activité apoptotique de CMYC a été explorée. En effet, il a été mis en évidence que certaines protéines du virus (EBNA1 et EBER) possédaient des propriétés anti-apoptotiques promouvant le processus tumoral (Kennedy and Sugden, 2003; Komano et *al*., 1999; Ruf and Sample, 1999). Il a été récemment démontré que la protéine virale LMP2A favorisait la prolifération des cellules qui ont une translocation *CMYC* et auraient dû par conséquent mourir (Bultema et *al*., 2009). LMP-1 est exprimée dans toutes les pathologies malignes et constitue l'oncogène majeur du virus. Elle est décrite comme l'oncogène majeur de l'EBV car son expression est nécessaire à la survie et à la prolifération des lignées transformées *in vitro*. Les propriétés oncogènes de LMP-1 sont liées aussi à sa capacité d'activer de façon chronique des voies de signalisation cellulaire telles que les voies NFkB, JNK et p38.

Des travaux ont montré que la protéine nucléaire EBNA2 peut stimuler la transcription de certains récepteurs cellulaires comme CD21 (récepteur de l'EBV) et CD23 (marqueurs d'activation des lymphocytes B) (Laux et *al*., 1994). Il a été aussi montré que la protéine EBNA-1 joue un rôle dans l'augmentation de l'activité des enhancers du gène IGH. D'autres travaux ont montré que les EBERs peuvent aussi intervenir dans la lymphoprolifération. En effet, la transfection des EBERs dans une lignée Akata qui a perdu l'EBV permet de rétablir le phénotype de cellules transformées observé dans les Akata EBV positives suggérant un rôle

oncogène des EBERs (Komano et *al*., 1999). La détection de l'expression de l'IL10 dans les tumeurs de BL EBV positives et l'observation que les EBERs peuvent induire l'expression de l'IL10 dans les lignées de cellules issues du BL suggèrent que l'IL10 pourrait être un élément important dans la pathogenèse du BL associé à l'EBV (Kitagawa et *al*., 2000).

Ces résultats renforcent l'importance du rôle de l'EBV et son implication dans les mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse (Magrath and Reeve, 1993). Ainsi, le rôle de l'EBV dans la pathogénèse du BL laissent encore beaucoup de questions ouvertes (Bornkamm, 2009a; Bornkamm, 2009b).

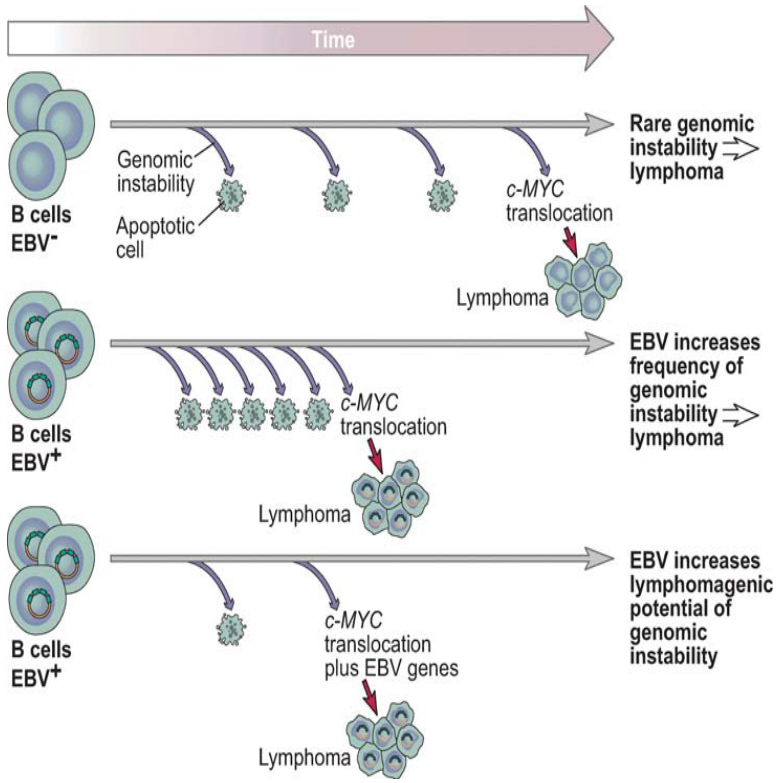


Figure 22. Hypothèses pour expliquer le rôle de l'infection EBV dans la formation des BL (Kutok and Wang, 2006).

Le second virus connu pour intervenir dans la genèse des lymphomes est le virus VIH-1. Son rôle dans la délocalisation du *CMYC* au voisinage du gène *IGH* ayant été étudié, nous allons, comme pour le virus EBV, préciser sa structure, son cycle et son rôle physiopathologique dans la lymphomagenèse.

3.3.2. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1)

Historiquement, Robert Gallo et son équipe ont découvert le premier rétrovirus humain, HTLV-1 et ont supposé qu'un mutant de ce dernier était la cause du syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (SIDA). Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), lentivirus-rétrovirus, a été isolé en 1983 par l'équipe du professeur Luc Montagnier à l'Institut Pasteur et identifié comme l'agent étiologique du (SIDA).

Le développement tumoral lors de SIDA est généralement attribué à une défaillance de la surveillance immunitaire lors d'infections par des virus oncogènes. Cependant, un nombre croissant de preuves suggèrent que le VIH-1 et ses protéines virales peuvent jouer un rôle plus direct dans le développement tumoral.

L'infection VIH-1 entraine, dès la phase initiale, des modifications du compartiment lymphocytaire B avec une stimulation directe des lymphocytes B par les antigènes viraux et une réorganisation viro-induites des microenvironnements successifs des cellules B, et plus particulièrement des centres germinatifs. Cette dérégulation du compartiment B par le VIH-1 peut mener à des manifestations auto-immunes et des lymphomes B.

3.3.2.1. La structure du VIH-1

Le VIH-1 appartient à la famille des rétrovirus et plus précisément à la sous-famille des lentivirus. Ce virus, à ARN enveloppé, est une particule isocaédrique, dont le diamètre varie de 80 à 120 nm.

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche phospholipidique dérivant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle contient des protéines cellulaires et virales. L'une des glycoprotéines virales est transmembranaire (gp41) et l'autre externe (gp120) (Figure 23). Les protéines gp120 et gp41 sont liées par des interactions non covalentes à la surface de la cellule infectée ou du virion. La gp120 contient les sites de liaison au récepteur cellulaire CD4, CR2 ou CD21 et aux corécepteurs CCR5, CXCR4 etc... La capside, de structure conique, est formée par l'assemblage des protéines p24. Elle renferme d'une part le génome composé de deux brins d'ARN monocaténaires à polarité positive associés aux protéines de nucléocapsides p6 et p7 et, d'autre part, les enzymes virales indispensables à la réplication et à la maturation du virus : la transcriptase inverse formée des sous-unités p66 et p51, la

protéase p15 et l'intégrase p32. La matrice, formée de protéines p17 entoure la capside, contribue à la stabilisation du virion et participe au recrutement des protéines de l'enveloppe.

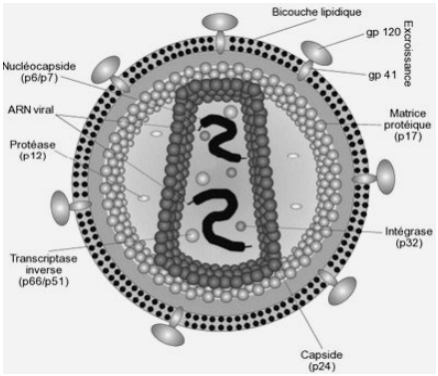


Figure 23. Structure schématique du VIH-1 - Illustration: Sanao/Licence de documentation libre GNU.

3.3.2.2. Génome viral du VIH-1

Le matériel génétique est composé d'un ARN simple brin en deux exemplaires accompagné de trois enzymes: la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. Le génome du VIH est composé de neuf gènes alors que, par comparaison, le génome de l'homme comprend 25000 à 30000 gènes. Le génome viral est composé de trois gènes de structure (gag, pol et env), quatre gènes accessoires (vif, vpr, vpu et nef) et deux gènes de régulation (tat et rev) (Figure 24).

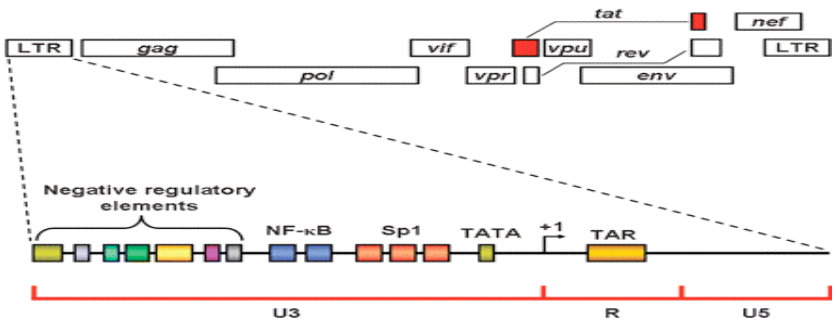


Figure 24. Organisation du génome du VIH-1. La structure détaillée de la LTR est affichée en bas de l'image. Le VIH-1 LTR contient de nombreux sites de liaison aux protéines. Certains des sites de liaison aux protéines, tels que des éléments de régulation négative, réguler négativement la transcription du génome du VIH-1 en se liant à des protéines régulatrices. Le VIH-l LTR contient également une boîte TATA, deux répétitions directes de *NF-κB* et trois répétitions en tandem de sites Sp1. Tat recrute les facteurs de transcription sur le LTR activant donc la transcription du génome du VIH-1 (Romani et *al*., 2010).

- Les gènes codés par le VIH-1

Le VIH-1 possède neuf gènes, qui assurent son développement et sa multiplication. Certains sont indispensables à sa survie et d'autres accessoires à celle-ci. La connaissance de l'ensemble de leurs rôles respectifs et des fonctions des protéines associées (cf. Tableau 3) apparaît déterminante pour déterminer une cible potentielle sur le plan thérapeutique.

- **Gag** (Group Specific Antigen) code pour les protéines de la matrice et de la capside du virus.
- **Pol** (polymérase) assure la fabrication des trois enzymes indispensables à la réplication virale: la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase.
- **Env** (enveloppe gp120) synthétise les protéines de l'enveloppe virale.
- **Nef** (Facteur Négatif) : la protéine Nef joue un rôle fondamental dans la propagation du virus et dans l'évolution de l'infection vers un SIDA dit « installé ». Au niveau des cellules infectées, elle diminue l'expression du récepteur CD4 et des molécules du CMH de classe I. Elle permet aussi, chez les individus infectés, de maintenir une charge virale élevée.
- **Vif** (Facteur d'Infectivité Viral) code pour la protéine Vif qui permet une meilleure maturation des virions et diminue le nombre de particules virales défectueuses.
- **Vpr** (Protéine Virale R) code pour la protéine « Vpr » qui facilite le transfert du « complexe viral de préintégration » du cytoplasme de la cellule hôte vers son noyau.
- **Vpu** (Protéine Virale U) : la protéine Vpu, spécifique du VIH-1 (elle est remplacée par Vpx pour VIH-2), facilite la libération des particules virales lors du bourgeonnement et permet aussi la dégradation du CD4.
- **Rev** (Regulator of Viral Expression) code pour la protéine Rev qui intervient dans l'export des transcrits non épissés vers le cytoplasme.

- **Tat** (transactivateur de transcription viral) : le gène Tat génère une protéine aux fonctions fondamentales pour la multiplication du virus. Elle permet notamment la transcription de l'ADN viral en recrutant l'ARN polymérase. Le mode d'action de cette protéine sur la délocalisation *CMYC-IGH* (réorganisation nucléaire) a particulièrement été étudié dans notre travail et va être l'objet d'un chapitre.

Gènes	Protéines et fonctions
gag (de l'anglais *Group-Specific Antigen*)	Protéines de structure
pol (polymérase)	Transcriptase inverse, protéase, intégrase
env (enveloppe)	Gp120 : attachement/gp41 : fusion
tat (*Transactivator*)	Régulateur positif de la transcription
rev (*Regulator of Viral Expression*)	Export des transcrits non épissés hors du noyau
vif (*Viral Infectivity*)	Empêche la désamination de l'ADN viral en liant la protéine antirétrovirale APOBEC3G
vpr (*Viral Protein R*)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
vpu (*Viral Protein U*)	Réduit l'expression du CD4
nef (*Negative-Regulation Factor*)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4

Tableau 3: fonctions des protéines de régulation du VIH-1.

3.3.2.2.1. La protéine Tat du VIH-1

Une défaillance immunitaire de la surveillance des infections par des virus oncogènes favorise le développement de tumeurs chez le patient atteint de SIDA. Un nombre croissant de publications suggère que le V IH-1 et ses protéines peuvent jouer un rôle plus direct dans le développement tumoral.

Le VIH-1 code pour une petite protéine activatrice de la transcription Tat de structure relativement conservée (Jeang and Gatignol, 1994) et de taille variable entre 86 et 104aa. La protéine Tat est produite d'une manière précoce dans le cycle viral. Elle joue un rôle crucial dans la réplication et la prolifération virale. La mutation de cette protéine abolit totalement la réplication virale (Ruben et *al*., 1989). La protéine Tat est sécrétée par les cellules infectées et peut agir sur les cellules environnantes infectées et non infectées.

a- Structure de la protéine Tat-VIH-1

Tat est une protéine de 14 à 16 kDa, localisée dans le noyau et plus particulièrement au niveau du nucléole. La protéine Tat est codée par deux exons situés, dans le génome viral, de

part et d'autre du gène Env. L'exon 1 code par la région N-terminale (1-72aa) et l'exon 2 code par la région C-terminale (78-101aa) (Bayer et *al*., 1995; Rubartelli et *al*., 1998).

La protéine Tat est composée de six domaines fonctionnels, schématisés sur la figure (Figure 25) :

- Le Domaine I (1-21aa), N-terminal, riche en prolines, présente un résidu tryptophane conservé en position 11, essentiel pour le relargage de Tat par les cellules infectées et pour sa translocation dans le cytosol des cellules avoisinantes (Johri et *al*., 2011). Une mutation dans cette région affecte peu l'activité de transcription.

- Le Domaine II (20-40aa) contenant 7 cystéines hautement conservées en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37 est important pour l'activité de Tat. La mutation de chacune de ces cystéines à l'exception de la cystéine en position 31 entraine une perte de la capacité de transactivation de Tat. La région II est essentielle pour l'activité de transactivation de Tat (Johri et *al*., 2011).

- Le Domaine III (40-48aa) « core » est riche en résidus hydrophobes. Il présente une phénylalanine conservée en position 38 et la séquence 41KGLGISYG48 conservée entre les résidus 41 et 48 (Johri et *al*., 2011).

- Le Domaine IV (49-57aa) basique, contenant la séquence de localisation nucléaire, est impliqué dans l'interaction et la pénétration de Tat extracellulaire dans les différents types cellulaires infectés ou non (Mann and Frankel, 1991).

- Le Domaine V (57-72aa) riche en acides glutamiques permet la liaison à l'ARN.

- Le Domaine VI (72-101aa) est codé par le second exon. Cette région est facultative pour la transactivation « *in vitro* » mais nécessaire « *in vivo* ») (Campbell et *al*., 2009). Un tripeptide arginine-glycine-acide aspartique RGD est impliqué dans l'interaction avec les intégrines αv β3 et α1β5 (Zocchi et *al*., 1997).

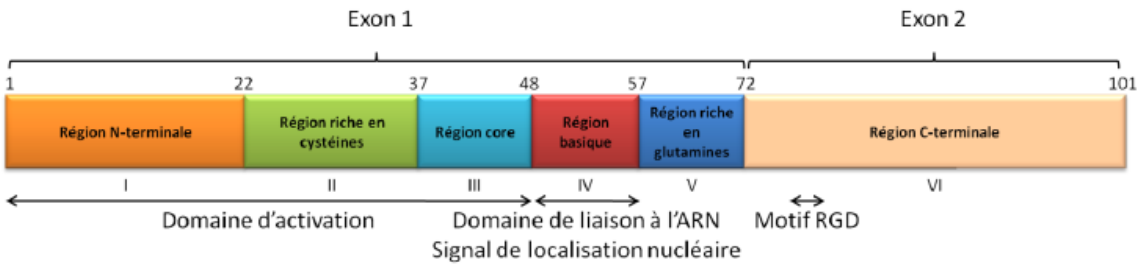


Figure 25. Organisation de la protéine Tat

b- Fonction et Mécanismes de la protéine Tat-HIV-1

La protéine Tat du VIH-1 est une protéine multifonctionnelle. Elle agit au niveau intracellulaire, extracellulaire et par internalisation.

- **Action de Tat au sein de la cellule infectée par le VIH-1**

Elle est essentielle pour la réplication virale. Elle se fixe sur une séquence de 45 nucléotides appelée TAR une structure « tige-boucle » spécifique, présente à l'extrémité 5' des ARNm viraux (Berkhout et *al*., 1989; Dingwall et *al*., 1989). Tat augmente l'efficacité de l'initiation de la transcription du génome viral à partir du promoteur LTR et également le taux de transcription par élongation de la transcription (Cullen, 1990; Sharp and Marciniak, 1989) (Hauber et *al*., 1987; Southgate and Green, 1991) (Feinberg et *al*., 1991; Frankel, 1992; Laspia et *al*., 1990). Ces deux processus peuvent intervenir de concert.

La trans-activation de l'expression du VIH par la protéine Tat fait suite à la formation d'un complexe avec la région TAR.

Des études *in vitro* ont montré que l'activité de transactivation de la protéine Tat nécessite l'interaction avec la machinerie cellulaire de transcription. Une étape essentielle à la transactivation par la protéine Tat est le recrutement d´un complexe protéique, P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) sur la séquence TAR (Barboric et *al*., 2000; Barillari et *al*., 1993; Gold et *al*., 1998). P-TEFb est composé de la cycline T1 (Cyc T1) et de CDK9 (Cyclin-Dependant Kinase 9). La cycline T1 se lie aux domaines « core » et au résidu cystéine de Tat et interfère avec Tat et la séquence TAR naissante. Ce complexe augmente fortement l´affinité et la spécificité de la liaison de Tat avec la séquence TAR (Zhou et *al*.,

1998). La CDK9, phosphoryle le CTD (*C terminal domain*) de l´ARN polymérase II, ce qui aurait pour effet d'augmenter l´efficacité de l´élongation lors de la transcription du LTR (Zhou et *al*., 1998).

En absence de Tat, l'élongation de la transcription est inefficace et conduit à la production de transcrits courts (Kao et *al*., 1987). Les ARN viraux produits sont majoritairement tronqués et non polyadénylés. En revanche, l'expression de Tat entraine la production d'ARN fonctionnels, entiers et polyadénylés.

- **Action de Tat dans l'environnement de la cellule infectée par le VIH-1**

Tat est secrétée par les cellules infectées dans le milieu extracellulaire où elle exerce des fonctions sur les cellules environnantes. La forme extracellulaire de Tat est capable de se fixer et de pénétrer dans les cellules cibles précisées ultérieurement (Cullen, 1986; Frankel and Pabo, 1988; Marcuzzi et *al*., 1992; Westendorp et *al*., 1994). Elle a également la capacité de pénétrer dans les cellules non infectées (Ensoli et *al*., 1993) ou infectées de manière latente. Tat-VIH1 peut influencer, par le même mécanisme de transactivation déjà précisé, l'expression des gènes et des protéines cellulaires dont les cytokines et leurs récepteurs. Elle favorise la sécrétion de cytokines intervenant dans la communication entre cellules et la prolifération cellulaire. Elle peut également agir directement à la manière d'une toxine entraînant une mort cellulaire des cellules T par apoptose et favorisant ainsi la progression de la maladie (Campbell et *al*., 2009).

- **Protéine Tat et internalisation cellulaire**

La protéine Tat peut être internalisée dans les cellules non infectées comme le montrent des études sur le processus d'internalisation de Tat dans les cellules T non infectées en utilisant essentiellement la voie d'endocytose (Vendeville et *al*., 2004) (Figure 26). Ce processus d'internalisation confère à la protéine Tat la capacité de pénétrer indifféremment dans de nombreux types de cellules. Les études initiales indiquaient que celle-ci était capable de rejoindre le cytosol et le noyau des cellules (Frankel and Pabo, 1988). Elle peut alors activer la transcription de virus latents lorsqu'ils sont présents et exercer des perturbations de l'homéostasie des cellules. En effet, cette protéine a été utilisée comme vecteur pour faciliter la transduction intracellulaire de protéines ou de macromolécules d'intérêts (Mann and Frankel, 1991). En 1994, la protéine Tat fut exploitée comme un outil de transport de

protéines, tels que la β-galacosidase, vers l'intérieur des cellules (Fawell et *al*., 1994). Après injection intraveineuse de Tat- β-galactosidase, l'enzyme fut détectée dans le foie, la rate, le cœur, les poumons et les muscles (Fawell et *al*., 1994). Des études postérieures ont déterminé le domaine protéique basique minimal (aa 49-57) responsable de la transduction cellulaire de la protéine Tat (Ezhevsky et *al*., 1997; Vives et *al*., 1997).

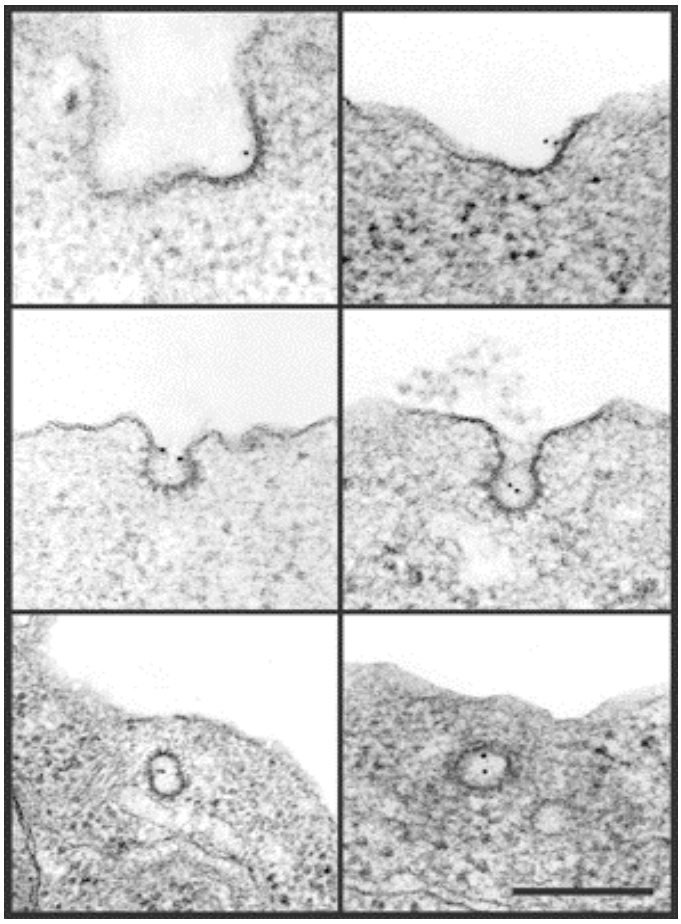


Figure 26. Internalisation de la protéine Tat (Vendeville et *al*., 2004)

La structure du génome viral VIH1, les différentes protéines codées par ce génome et plus particulièrement les différentes fonctions de la protéine Tat-VIH1 exposées, nous allons préciser le cycle biologique du virus VIH-1.

3.3.2.3. Cycle biologique du VIH-1

Le VIH-1, comme tous les virus à enveloppe, est fragile et peut être détruit par la chaleur (60°C) et par les antiseptiques (alcool, eau de javel…). Les particules virales sont généralement détruites après 5 à 6 heures hors d'une cellule. Les cellules présentant des récepteurs CD4 à leur surface sont les cellules cibles du VIH. Ainsi, les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales peuvent être infectées par le VIH-1.

- **Voies de contamination**

La contamination du VIH/Sida se fait selon trois principaux modes : voie sexuelle, voie sanguine et de la mère à l'enfant.

Quelles sont les cellules cibles du VIH-1 ?

3.3.2.3.1. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1

L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1 comporte trois phases chronologiques : une phase de primo-infection, une phase asymptomatique ou phase de latence clinique et une phase correspondant à l'apparition du stade SIDA (pour revue (Weber, 2001)).

Primo-infection: au cours de l'infection VIH, la période entre le contact infectant et le développement d'une réponse immune se nomme la primo-infection (PHI). La période d'incubation après le contact infestant est de 3 à 6 semaines. Les symptomes de la primo-infection VIH ressemble à la mononucléose infectieuse, elle peut passer parfois inaperçue. La primo-infection se caractérise par une phase de réplication virale intense associée à une dissémination virale rapide et à des altérations précoces du système immunitaire.

Phase asymptomatique ou phase de latence clinique : pendant cette période, la plupart des personnes infectées ne présentent aucun signe (ou peu) de l'infection au VIH. Cette phase dure jusqu'à 15 ans, 10 ans étant la moyenne. Pendant cette phase, le VIH continue de se reproduire et de détruire les cellules CD4+.

Le stade SIDA est caractérisé par la déplétion des lymphocytes T CD4+ circulants et par une augmentation rapide de la réplication virale. La chute du nombre de lymphocytes T CD4+ en dessous de 200/µL conduit à l'apparition de maladies opportunistes et de tumeurs, qui sont responsables du décès de l'individu.

3.3.2.3.2. Cellules cibles du VIH-1

In vivo, l'infection productive par le VIH-1 est observée dans les cellules exprimant la molécule CD4 : les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Cependant, d'autres réservoirs cellulaires ou anatomiques du VIH-1 peuvent être envisagés (pour revue (Blankson et *al*., 2002)).

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons étudié l'effet direct du VIH-1 sur les lymphocytes B naïfs (activation des lymphocytes B et distribution des gènes). Il faut noter, que les lymphocytes B ne peuvent pas être infectés par le VIH-1 et que les effets observés sont lié à l'interaction de différentes protéines virales avec ces cellules (voir les sections suivantes pour les détails).

3.3.2.4. Rôle du VIH-1 dans la lymphomagenèse B

Le risque de développer un LMNH lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est de 60 à 100 fois plus élevé que dans la population générale (Beral et *al*., 1999). Les LMNH restent une cause majeure de mortalité dans le cadre de l'infection par le VIH-1. L'incidence de survenue est plus ou moins corrélée aux faibles niveaux de lymphocytes T CD4+(Costello, 2010). Ces LMNH sont de phénotype B.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'infection VIH entraine, dès la phase initiale d'infestation, des modifications du compartiment lymphocytaire B avec une stimulation directe des lymphocytes B par les antigènes viraux et une réorganisation viro-induite des microenvironnements successifs des cellules B, et plus particulièrement des centres germinatifs.

Des souris transgéniques, exprimant les gènes du VIH sous le contrôle du promoteur CD4 humain, présentent une activation polyclonale des lymphocytes B, reflétée par une hyperglobulinémie, une accumulation d'anticorps anti-ADN-double brin, une prolifération et

une sécrétion spontanée d'IgM *in vitro*. Une accumulation des lymphocytes B dans les ganglions et la rate et un élargissement de la zone marginale sont observés.

Le risque de développer un LMNH est augmenté lors d'une infection par le VIH (Grulich et *al*., 2007; Ziegler et *al*., 1984). Le VIH dérégule la réaction immunitaire en induisant une activation polyclonale des lymphocytes B (Schnittman et *al*., 1986) et une production accrue de cytokines qui vont-elles mêmes accentuer la stimulation des lymphocytes B (Amadori et *al*., 1991). Par conséquent, le risque d'apparition de mutations « oncogéniques » est particulièrement important chez les patients séropositifs. Le VIH-1 infecte *in vitro* les lymphocytes B grâce à l'interaction CD21 et gp120. La protéine Tat (trans-activateur de transcription) du virus VIH-1 est capable d'affecter directement le processus de différenciation des lymphocytes B chez un patient VIH+ et favoriser l'apparition de lymphome de type B (Lefevre et *al*., 1999).

Certaines études *in vitro* ont démontré que les lymphocytes B peuvent être infectés par le VIH-1 voir transmettre le virus aux cellules T. Aucune étude fiable n'a démontré la présence de lymphocytes B infectés *in vivo* chez les patients VIH+. Les virions peuvent lier le récepteur de complément 2 (Cr2 ou CD21) présent sur les cellules B (Malaspina et *al*., 2002; Moir et *al*., 2000).

3.3.2.4.1. Activation polyclonale des lymphocytes B et infection par le VIH-1

Au cours de l'infection par VIH-1, une activation polyclonale des cellules B est détectée à un stade très précoce de l'infection (Lane et *al*., 1983; Levesque et *al*., 2009; Titanji et *al*., 2005). Le VIH-1 induit l'expansion du compartiment de cellules B activées chez les patients infectés. Cette prolifération excessive des cellules B favorise l'apparition de mutations oncogéniques.

Les cellules B expriment spontanément des immunoglobulines de surface en culture et présentent une susceptibilité accrue à l'apoptose (Ho et *al*., 2006) par l'intermédiaire du récepteur CD95, qui augmente la susceptibilité de ces cellules à l'apoptose induite par Fas. L'activation polyclonale des lymphocytes B chez les patients infectés par le VIH est accompagnée d'une production d'anticorps « polyréactifs » et d'auto-anticorps (Haynes et *al*., 2006; Lane et *al*., 1983; Levesque et *al*., 2009; Martinez-Maza et *al*., 1987; Titanji et *al*.,

2005) : en effet, on peut observer une production d'IgG et IgA polyclonaux accrue et demeurant élevée seulement lorsque les taux de cellules T CD4+ des patients sont très diminués. Des facteurs viraux tels que la liaison de gp120 aux lectines de surface des cellules B activées peuvent entraîner la commutation de classe, alors qu'un excès de BLyS (B-lymphocyte stimulator) peut favoriser la sécrétion d'anticorps (He et *al*., 2006). Certaines études tendent à démontrer qu'à la suite du traitement antirétroviral, une diminution des cellules B suractivées et une normalisation de l'hyperglobulinémie peuvent être observées (Moir and Fauci, 2008; Notermans et *al*., 2001; Titanji et *al*., 2005).

Cette donnée demeure toutefois controversée car plusieurs groupes ont observé, chez les patients traités, une grande hétérogénéité de la réponse des cellules B activées (niveaux élevés de marqueurs d'activation des cellules B et hypergammaglobulinémie (hyper IgG) (Fournier et *al*., 2002; Jacobson and Bredt, 2002).

L'activation polyclonale des lymphocytes B peut être induite par des interactions directes entre les virions ou des protéines virales et les lymphocytes B (Schnittman et *al*., 1986). La liaison des virions à CD21 induit l'activation des cellules B. Toutefois, le nombre de lymphocytes B qui interagissent directement avec les virions est faible et insuffisant pour expliquer l'importance de cette activation polyclonale B chez les patients infectés par le VIH. D'autres mécanismes indirects, systémiques, pourraient expliquer le phénomène de l'hyperactivation des lymphocytes B dans le cadre de l'infestation par le VIH-1 (Schnittman et *al*., 1986). Dans notre travail, nous avons essayé d'étudier le rôle de l'interaction entre gp120 et CD21 sur la distribution des gènes impliqués dans le LB.

D'autres facteurs peuvent induire une activation polyclonale lymphocytaire B (Figure 27):

* L'expression de Nef (rôle dans l'infectivité et la réduction du taux de CD4+) qui induit la sécrétion de ferritine dans des cellules infectées, notamment les macrophages. La ferritine contribue indirectement à l'activation polyclonale des lymphocytes B (Swingler et *al*., 2008),

* Les cytokines telles que l'IFN-α, TNF-α, IL-6 et IL-10, souvent retrouvées en excès chez les patients infectés par le VIH-1 et associées avec l'hyperactivation des lymphocytes B et à la production d'autoanticorps (Emilie, 1993; Rieckmann et *al*., 1991),

* De hautes concentrations de BLyS observées chez les patients infectés par le VIH et corrélées avec des taux élevés d'autoanticorps (Rodriguez et *al*., 2003),

* La liaison des TLR qui peut entraîner une sur-activation des cellules B. En effet, les cellules B naïves des patients infectés par le VIH sont « susceptibles » à l'activation de TLR-9, qui reconnaît l'ADN viral (Malaspina et *al*., 2008; Ruprecht and Lanzavecchia, 2006). Cette activation entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation non-spécifique des cellules B et des cellules T. De plus, de récentes études démontre que le TLR-4, qui n'est pas exprimé par les cellules B humaines dans des conditions homéostatiques, peut être activé dans certaines conditions inflammatoires chroniques (Jagannathan et *al*., 2009; Shin et *al*., 2009). L'activation du TLR-4 augmente le recrutement et la rétention des cellules B naïves dans les ganglions et entraîne leur activation polyclonale et leur prolifération (Hwang et *al*., 2009).

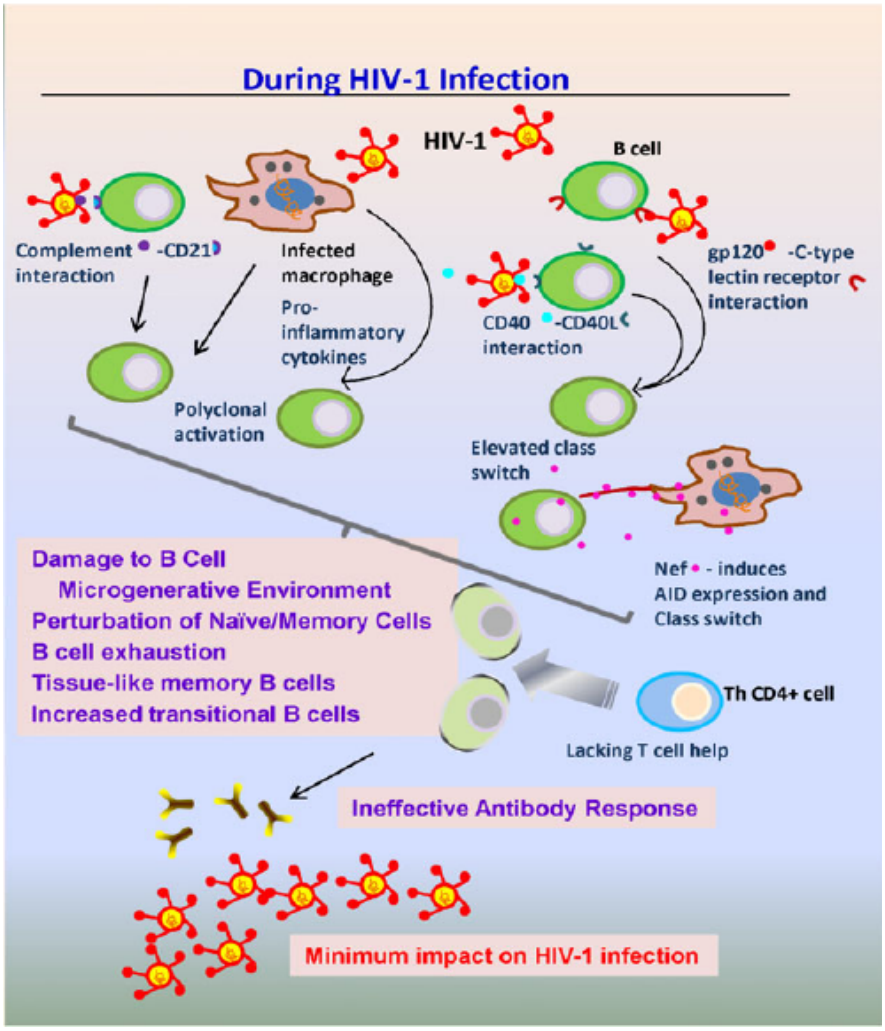


Figure 27. Conséquences de l'infestation du VIH-1 sur les lymphocytes B (Shen and Tomaras, 2010).

Des études ont montré que d'autres acteurs pouvaient intervenir dans le développement tumoral. La protéine Tat constitue un candidat car, outre son rôle principal dans la réplication virale, elle active la transcription virale et à la pathogénie de l'infection par le VIH-1.

3.3.2.4.2. Rôle de Tat dans la lymphoprolifération

Il a été montré que 30% des souris Tat-transgénique développaient un lymphome de type B, suggérant une contribution de la protéine Tat à son développement (Kundu et *al*., 1999).

La modulation des voies biologiques par Tat peut potentiellement affecter de nombreux aspects de cellules infectées et non infectées. Certains symptômes et pathologies associés au SIDA peuvent être secondaires à des activités directes ou indirectes de Tat (Aoki and Tosato, 2004; Nyagol et *al*., 2006; Turner, 1998).

Comme précisé auparavant, un défaut dans les voies de réparation pourrait être « inducteur » de cancer (Gregoire et *al*., 2001; Kuppuswamy et *al*., 1989). Plusieurs raisons telles que l'immunodéficience, les virus oncogènes et la protéine Tat du VIH-1, ont été proposées pour expliquer ce phénomène. Il a été suggéré que les défauts de réparation de l'ADN induites par Tat peuvent être impliqués dans le développement du cancer associé au SIDA (Nunnari et *al*., 2008).

Des travaux ont montré que les patients atteints de cancer avec VIH-1/Sida avaient des réactions tissulaires très graves et développent souvent des effets toxiques cutanés lorsqu'ils sont soumis à une radiothérapie. Des études *in vitro* utilisant une lignée cellulaire exprimant la protéine Tat suggèrent que cette dernière affecte les réponses cellulaires aux rayonnements ionisants. L'expression de la protéine Tat dans des lignées cellulaires humaines peut augmenter l'activité de prolifération des cellules, mais diminue leur capacité à réparer les cassures double brin radio-induites (Sun et *al*., 2006). Les carences de réparation de l'ADN induites par Tat peuvent jouer un rôle important dans le développement du cancer associé au SIDA. *In vitro*, Tat induit un stress oxydatif dans les cellules avec comme conséquence, des cassures au niveau de l'ADN cellulaire et le risque accru de translocations chromosomique.

Quel est le rôle de la protéine Tat dans la pathogénie de la maladie (SIDA) ? Cinq actions de Tat ont été individualisées.

a- Tat module l'expression des gènes cellulaires

En plus de son rôle dans la transactivation des gènes viraux, Tat est capable de moduler aussi l'expression des gènes cellulaires (Li et *al*., 2005; Stettner et *al*., 2009). Les effets de transactivation induite par Tat ne sont pas limités aux cellules infectées par le VIH, ils impliquent aussi les cellules non infectées. En effet, la protéine Tat extracellulaire, libérée par les cellules infectées par le virus, est capable de pénétrer dans les cellules non infectées et transactiver directement les gènes cellulaires (Ju et *al*., 2009). La protéine Tat extracellulaire modulerait ainsi l'expression des gènes cibles dans les cellules non infectées.

Il a été montré une interaction de Tat avec différents récepteurs cellulaires : les molécules d´adhésion de la famille des intégrines *via* le domaine RGD (Barillari et *al*., 1993)**,** le récepteur VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) via le domaine basique (Albini et *al*., 1996) et les récepteurs des cytokines ayant un motif cystéine CC, les CCR2, CCR3 et les cytokines ayant un motif CXC, le CXCR4 via les domaines « core » et cystéine. Des travaux ont montré que Tat peut réguler positivement les niveaux d'expression d'un nombre de cytokines, le VIH-1 co-récepteur CCR5 et l'interleukine-2 (IL-2) récepteur (CD25) dans les cellules infectées par le VIH-1 (Mayol et *al*., 2007; Stettner et *al*., 2009; Zheng et *al*., 2005). Tat extracellulaire augmenterait la transcription de l'IL-6 et de l'IL-2 et induirait la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α par les monocytes/macrophages (Mayne et *al*., 2000; Rubartelli et *al*., 1998). Tat serait impliquée dans la modulation des niveaux d'expression de nombreux gènes.

Tat réprime également l'expression de plusieurs gènes, tels que le complexe majeur d'histocompatibilité qui code pour le gène (CMH) classe I (Matsui et *al*., 1996) et régule l'expression de gènes cellulaires qui eux-mêmes induisent l'apoptose et l'immunosuppression (Bennasser and Bahraoui, 2002; Gupta et *al*., 2008; Poggi and Zocchi, 2006; Zheng et *al*., 2005). *In vivo*, Tat est capable de déréguler l'expression de cytokines (IL-4, IL-10) (Bennasser and Bahraoui, 2002; Scala et *al*., 1994; Westendorp et *al*., 1994) : les molécules pro-inflammatoires ainsi que IL-10 et IL-4 sont plus exprimées dans les cellules monocytes traitées avec Tat en comparaison des cellules non traitées.

b- Tat induit un déficit de la réparation de l'ADN

L'instabilité des voies de réparation de l'ADN qui maintiennent la stabilité génomique est un facteur favorisant connue de carcinogénèse (Bernard-Gallon et *al*., 2008; Bowater et *al*., 2009). Il a été suggéré que les défauts de réparation d'ADN induits par Tat pourraient être impliqués dans le développement de cancers associés au SIDA (Nunnari et *al*., 2008). Des expériences *in vitro* ont montré que l'expression de la protéine Tat dans les lignées cellulaires humaines peut augmenter l'activité de prolifération des cellules mais diminuer leur capacité à réparer les cassures radio-induites « double brin » de l'ADN (Sun et *al*., 2006). Les patients VIH-1/SIDA atteints de cancer présentent de graves réactions tissulaires et développent souvent des effets toxiques cutanés post- radiques. Des expériences *in vitro* ont montré que les lignées cellulaires humaines exprimant Tat voient complètement réduite leur capacité à réparer les cassures d'ADN induites par le rayonnement (Sun et *al*., 2006).

c- Tat induit un stress oxydatif

Le stress oxydatif modifie la physiologie cellulaire normale. Une augmentation du niveau de stress oxydatif est observée chez les patients atteints du SIDA. Il a été montré que la protéine Tat était responsable du stress oxydatif *in vitro*. Il existerait une relation entre les dommages induits par Tat et l'altération de la voie « Redox » dans l'épithélium non-intestinal. Ce stress peut être partiellement inhibé par un traitement avec des antioxydants (Penza et *al*., 2008). Price et ces collègues montrent que le stress oxydatif induit par Tat dépend du temps d'incubation cellulaire à cette protéine. Il a été montré que la protéine Tat augmentait le stress oxydant en diminuant l'activité d'une enzyme protectrice, la Mn-superoxyde dismutase (SOD) [S. Flores, Shreveport, USA]. Il en résulte une dérive du potentiel redox des cellules vers des conditions peroxydantes.

d- Apoptose induite par Tat suite à la modification de la dynamique des microtubules

Il y a deux voies d'activation de l'apoptose: la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque. Des travaux ont montré que la protéine Tat extracellulaire induisait l'apoptose cellulaire ainsi qu'un effet d'immunosuppression (Li et *al*., 1995). Les cellules Jurkat exprimant Tat et cultivées dans un milieu sans sérum sont plus sensibles à l'apoptose. L'incubation de cellules lymphocytaires non infectées en présence de Tat purifiée favorise l'apoptose. Un lien entre la

polymérisation des microtubules et l'effet pro-apoptotique de Tat a été suggéré. Cette perturbation dans le réseau de microtubules serait un puissant inducteur de la voie mitochondriale de l'apoptose cellulaire (Romani et *al*., 2010). Chen et col. ont montré que la protéine Tat interagissait directement avec les dimères αβ-tubuline et les microtubules polymérisés dans le cytoplasme de la cellule (Chen et *al*., 2002).

e- Tat induit le remodelage de la chromatine

Afin que les facteurs d'initiation puissent accéder au site du promoteur, une ouverture de l'ADN double brin est nécessaire par remodelage de la chromatine. Ce remodelage fait intervenir une machinerie cellulaire spécialisée avec des enzymes capables de modifier les histones par acétylation, phosphorylation ou méthylation, rompant ainsi les liaisons ADN-histones et permettant la « translocation » des nucléosomes (pour une revue (Berger, 2002)).

Le remodelage de la chromatine est indispensable pour la transcription des gènes viraux du VIH-1. Tat-HIV-1 interviendrait dans les étapes de remodelage de la chromatine en favorisant le recrutement d'un grand nombre de facteurs cellulaires énoncés ci-dessous.

Tat exerce ses propriétés de transactivation en utilisant les facteurs de remodelage de la chromatine et des mécanismes spécifiques à la cellule hôte pour l'initiation de la transcription et l'élongation. Des complexes modificateurs de la chromatine facilitent le « déroulement » des nucléosomes et l'accessibilité à la transcription. Certains complexes sont ATP-dépendant, constitués de protéines dont certaines présentent un domaine helicase/ATPase comme les familles SWI/SNF et ISWI et modifient les interactions histone-ADN (Narlikar et *al*., 2002; Varga-Weisz and Becker, 2006). D'autres complexes, sont composés d'histones acétyltransférases (HAT) et d'histone désacétylases (HDAC) et modifient la structure du nucléosome en régulant l'acétylation des histones (Verdone et *al*., 2005).

Tat recrute également les protéines TBP (TATA Binding Protein), TFIIB et P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) afin de former un complexe de pré-initiation active (PIC) au niveau du promoteur. Ce PIC est compétent pour déclencher l'initiation de la transcription par « mobilisation » de la polymérase et l'élongation.

Enfin, Tat interagit avec CDK9 et la cycline T1. La CDK9 phosphoryle le CTD (C terminal domain) de l´ARN polymérase II, avec comme conséquence, une augmentation de l´efficacité de l´élongation lors de la transcription du LTR, région terminale non codante du virus VIH1

(Zhou et *al*., 1998). La cycline T1 se lie aux domaines « core » et cystéine de Tat et participe avec Tat à une forte interaction avec la séquence TAR naissante. L'interaction Tat –TAR se produit sans l'intermédiaire de Cyc-T1 (Barboric et *al*., 2000; Bogerd et *al*., 2000). Cependant, le recrutement de Cyc T1 sur la séquence TAR augmente l'efficacité de Tat (Bogerd et *al*., 2000).

3.3.2.5. Tat comme cible vaccinale et/ou thérapeutique

Le rôle essentiel de la protéine Tat dans l'expression du virus et son implication dans le cycle viral et la pathogénicité du VIH font de cette protéine une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapeutiques antivirales, à savoir :

- L'identification du rôle crucial de Tat dans la transcription du génome du VIH-1 et l'utilisation de médicaments antirétroviraux (Daelemans et *al*., 2000; Turpin, 2003).

- L'interaction de Tat avec TAR avec le développement d'un inhibiteur de l'interaction Tat-TAR pour maintenir le virus dans un état latent. De plus, Tat induirait une immunité humorale et cellulaire antivirale cytotoxique (Apolloni et *al*., 2003; Vives et *al*., 1997).

- La capacité de Tat à traverser la membrane cellulaire avec l'utilisation de polypeptides ou anticorps dirigés contre des cellules cibles. Différentes substances conjuguées à Tat acquièrent la capacité de traverser la membrane cellulaire (Hu et *al*., 2006; Schwarze et *al*., 2000). Ces résultats pourraient avoir d'importantes implications thérapeutiques pour l'avenir.

Il faut cependant rappeler que Tat pourrait avoir des effets variables en fonction du type cellulaire et en raison de son effet modulateur sur l'expression des gènes cellulaires et viraux. Une meilleure compréhension du mécanisme par lequel le Tat VIH-1 module l'expression des gènes dans les cellules infectées par le VIH, peut révéler le mécanisme détaillé par lequel le VIH affaiblit le système immunitaire.

OBJECTIFS

Le lymphome de Burkitt (BL) est due dans 80% des cas à une translocation chromosomique t(8;14) (q24;q32). Cette translocation marque l'événement initial de la transformation maligne d'une cellule B normale, par délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline *IGH* par le mécanisme de réparation de l'ADN : NHEJ durant l'hypermutation somatique (SMH).

La proximité prolongée des autres gènes avec le gène *IGH* dans le noyau des lymphocytes B facilite une translocation et peut augmenter les taux des cellules cancéreuses durant la SHM et ceci grâce à la réparation infidèle par le mécanisme NHEJ. Il a été montré par Osborne et collaborateurs en 2007 ainsi que par notre équipe (article en cours de soumission à Blood) que dans les lymphocytes B naïfs les gènes *IGH* et *CMYC* étaient distants (Osborne et *al*., 2007). L'objectif de notre étude, est de déterminer les origines possibles de la translocation t(8;14) (q24;q32) dans les lymphocytes B.

L'équipe de Peter Fraser a montré que l'activation des lymphocytes B naïfs de souris par le cocktail (anti CD40, anti IgM et IL4) induit le rapprochement et la colocalisation des loci IgH et CMyc. Nous avons testé l'effet de l'activation des lymphocytes B humains sur la réorganisation des deux loci *IGH* et *CMYC*.

Le virus Epstein-Barr (EBV) est détecté dans la majorité des BL en Afrique. Pourtant, le même cancer en Europe est plutôt lié à l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH-1). La translocation t(8;14) (q24;q32) qui apparaît durant les étapes de différenciation des lymphocytes B et encore plus importante chez les patients infectés par l'EBV et le VIH-1.

Mon travail de thèse a comme objectif l'étude d'étudier les remaniements nucléaires provoqués par l'activation des lymphocytes ou une infection par les virus EBV et VIH-1 et de décrire leurs implications dans le BL

RESULTATS

Le lymphome de Burkitt (BL) est caractérisé dans 80% des cas par la t(8;14) qui délocalise l'oncogène CMYC du côté du locus de l'immunoglobuline codant pour la chaîne lourde *IGH*. Il a en effet été démontré que la proximité spatiale des territoires chromosomiques dans le noyau favorise les translocations entre chromosomes mais aussi les réarrangements entre gènes, on devrait observer certains réarrangements plus fréquemment que d'autres (Nikiforova et *al*., 2000). En effet, la translocation sous entend nécessairement qu'il existe un contact entre le chromosome 8 et le chromosome 14 et donc une proximité physique entre les régions 8q24 et 14q32. Il nous a donc semblé pertinent de suivre la localisation des régions impliquées dans le développement du BL.

1. Analyse de la localisation nucléaire des gènes *CMYC* et *IGH*

La première partie de nos travaux, a consisté à déterminer la position physique ainsi que la distance intergénique au sein du noyau des régions génomiques impliquées dans le BL. Nous avons pour cela observé la position des loci *IGH* (14q32) et *CMYC* (8q24) dans des lymphocytes B de donneurs sains. Pour cette étude la technique de FISH (Fluorescent in situ hybridization) a été utilisée, celle-ci, permet en effet de visualiser des régions génomiques dans des noyaux cellulaires dont la morphologie et les structures sont préservées. Cette méthode, couplée à la microscopie confocale, permet une localisation précise des régions marquées.

L'étude de la localisation des gènes *IGH* et *CMYC* est réalisée à partir des mesures de distances « gène-membrane nucléaire » et « gène-gène ». En effet, ces deux paramètres nous ont permis d'estimer la position des gènes dans le noyau, et le degré de rapprochement ou de colocalisation entre les gènes, comme décrit sur le schéma ci-dessous (Figure 28).

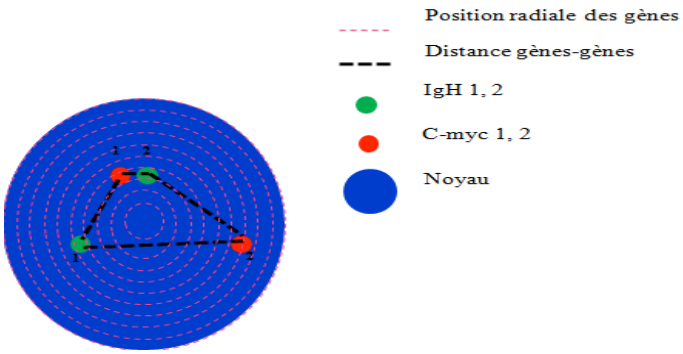


Figure 28. Positionnement des gènes dans le noyau. Position des gènes *IGH* et *CMYC* par rapport à la membrane nucléaire et la distance intergénique.

1.1. Position des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B normaux

Des lymphocytes B triés à partir du sang périphérique de donneurs sains ont été fixés puis hybridés avec un mélange de sondes ciblant les locus *IGH* et *CMYC*, marquées avec deux fluorochromes différents (Spectrum Green pour *IGH* et Spectrum Orange pour *CMYC*). Le noyau a ensuite été marqué à l'aide du To-PRO 3 iodide pour obtenir une meilleur délimitation des contours des noyaux afin de déterminer la distance radiale des loci marqués. Des images de ces cellules triplement marquées (*IGH*, *CMYC* et noyau) ont été acquises par microscopie confocale (Figure 29).

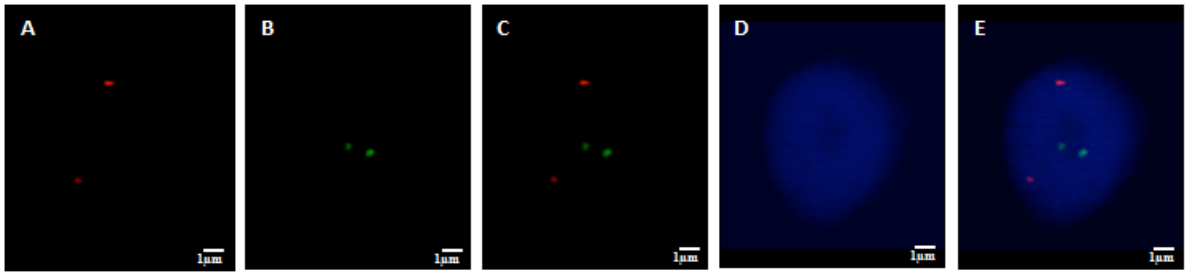


Figure 29. FISH en 3D sur des lymphocytes B normaux.
Projections en Z de tous les plans de piles d'images de microscopie confocale. (A) le locus *CMYC* en rouge (sonde couplée au spectrum orange). (B) le locus *IGH* apparait en vert (sonde couplée au spectrum green). (C) merge des deux loci. (D) Le noyau est marqué à l'aide du To-PRO3 visible en bleu sur ces images et (E) image triplement marquée *(IGH*, *CMYC* et noyau).

1.1.1. Position radiale différente des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B naïfs

Afin de déterminer les distances à étudier dans le noyau, le programme du logiciel a été optimisé (logiciel développé par l'INRA de Jouy en Josas) ce qui permet de calculer les distances radiales et la distance intergénique des gènes étudiés *IGH* et *CMYC*. Tous les noyaux ont été normalisés par le logiciel, la valeur zéro a été attribuée pour la membrane nucléaire et la valeur 1 pour le centre du noyau. La localisation radiale permet de déterminer la position nucléaire tridimensionnelle de chaque allèle étudié. La figure ci-dessous illustre les résultats obtenus suite à l'analyse de 273 noyaux des lymphocytes B (Figure 30).

Les mesures présentées dans la figure montrent que le locus *IGH* occupe une position centrale dans le noyau (0,7-1), la majorité des allèles sont répartis au centre du noyau (0,9-1). En revanche le gène *CMYC* est plutôt péricentral (0,5-0,8), le maximum d'allèles sont localisés entre (0,7-0,8) (Figure 30).

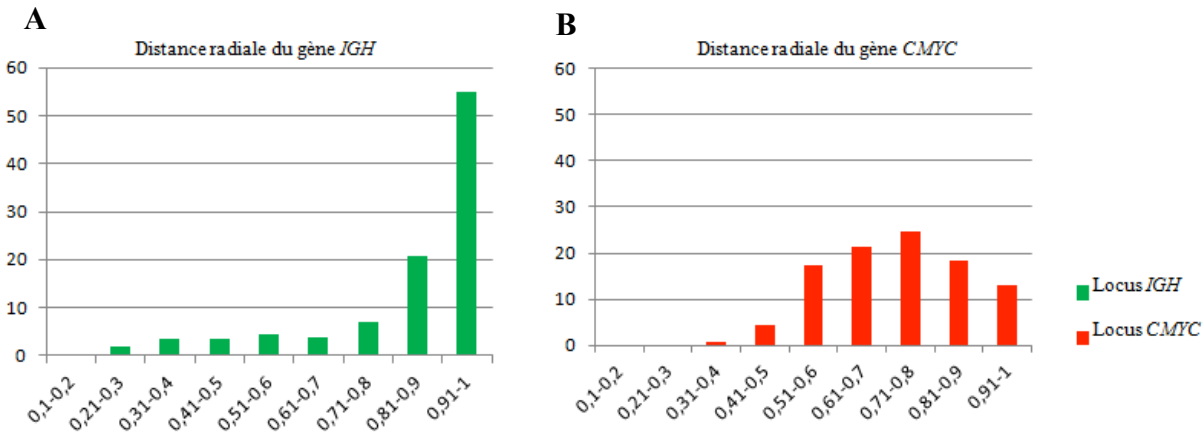


Figure 30. Distance radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B normaux. La valeur 0 détermine la périphérie du noyau alors que 1 constitue le centre du noyau. Ordonnées: pourcentage des signaux et Abscisse: distance théorique. Le locus *IGH* (vert) se retrouve au centre du noyau contrairement au locus *CMYC* qui est plutôt péricentral. Pour cette étude 273 noyaux ont été comptabilisés.

1.2. Colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs

Nous avons ensuite évalué la distance intergénique séparant les gènes hétérologues afin de déterminer le dégrée de rapprochement et la colocalisation entre les gènes. Le logiciel nous permet de calculer la distance qui sépare les deux centres de masse géométrique des signaux émis par les gènes *IGH* et *CMYC*. Pour que le logiciel puisse distinguer le spot du bruit de fond dans l'image, il est indispensable au début de modifier les paramètres. Chaque noyau de cellules B naïves émet deux signaux par gène, on obtient ainsi 4 mesures pour chaque échantillon de cellules. Toutes ces mesures sont fournies par le logiciel d'une manière ordonnée et classée en format Excel. Chaque tableau Excel est relié à l'image qui lui correspond, ce qui nous permet à la fin des analyses de vérifier et d'éliminer les fautes réalisées par le logiciel, notamment lorsqu'il s'agit de retrouver les bons spots (malgré le seuillage effectué au début de l'analyse, le logiciel peut commettre des erreurs de reconnaissance de spot).

Deux gènes hétérologues sont considérés proximaux ou colocalisés si la distance qui les sépare varie entre 0 et 1µm. Lorsque la distance entre les gènes *IGH* et *CMYC* dépasse 1µm, les gènes sont considérés comme non colocalisés. Pour cette étude, nous avons analysé 273 noyaux des lymphocytes B normaux. Les distances calculées entre les gènes *IGH* et *CMYC* nous ont permis de déterminer 13 noyaux seulement avec *IGH-CMYC* colocalisés, et 260 noyaux avec signaux non colocalisés (Figure 31).

Nous pouvons conclure pour cette première partie que les gènes *IGH* et *CMYC* occupent deux positions radiales différentes au sein du noyau des lymphocytes B naïfs humains, et que leur colocalisation est rare (4,76%).

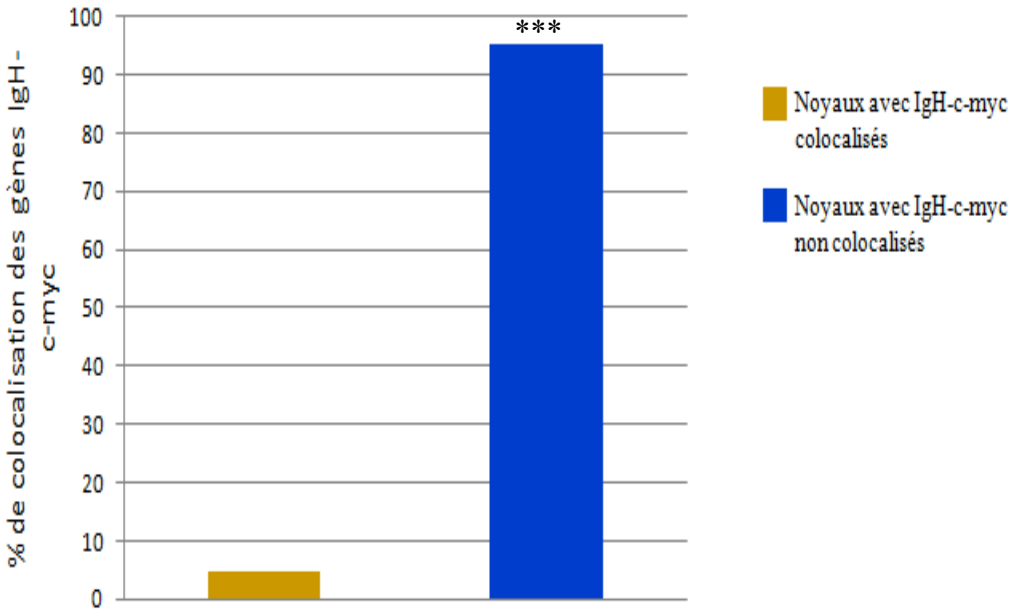


Figure 31. Pourcentage des noyaux présentant ou pas des colocalisations des loci *IGH-CMYC*. Les signaux *IGH* et *CMYC* séparés par une distance ≤ à 1µm sont considérés comme colocalisés. Pour cette étude 273 noyaux ont été comptabilisés. *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

La translocation entre les loci *IGH* et *CMYC* nécessite leur proximité. Pour cela nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de l'effet de l'activation des lymphocytes B sur la position et la colocalisation des régions 8q24 et 14q32.

2. Position des loci *IGH* et *CMYC* après activation des lymphocytes B naïfs

L'équipe de Fraser a montré que l'activation des lymphocytes B de souris, induit la colocalisation des loci IgH et cMyc (Osborne et *al*., 2007). En se basant sur ces resultat, nous avons voulu étudier l'effet de l'activation des lymphocytes B humains sur la position des gènes *IGH* et *CMYC* et leurs colocalisations en comparaison avec des lymphocytes B naïfs.

2.1. Activation des lymphocytes B naïfs humains par le cocktail anti-CD40, anti-IgM et IL4

Pour tester l'effet de l'activation des lymphocytes B naïfs, sur le positionnement des gènes *IGH* et *CMYC* dans le noyau, nous avons réalisé une cinétique d'activation des cellules B (0h, 24h, 48h et 72h) par un cocktail de cytokines et d'anticorps utilisé par l'équipe de Fraser : anti-CD40, anti-IgM et IL4. Afin de vérifier l'activation des cellules, nous avons procédé à un marquage membranaire des lymphocytes B. Nous avons utilisé les anticorps suivants: anti-CD19, anti-CD23, anti-CD69 et anti-CD80. L'anticorps anti-CD19 est un marqueur de cellules B qui nous permet de vérifier la pureté de notre échantillon après le tri magnétique. Les anticorps CD23, CD69 sont des marqueurs d'activation précoce et tardive des cellules B. En revanche, l'anticorps CD80 est seulement un marqueur tardif de l'activation. L'analyse par cytométrie en flux a montré une activation des lymphocytes B naïfs 24h après incubation avec les cytokines. Nous avons noté une augmentation très importante de l'expression des marqueurs CD23, CD69 et CD80 au cours de la cinétique d'activation de l'ordre de (62,7%, 57,7% et 26%) à 24h, (72%, 71,2% et 67,8%) à 48h et (18,8%, 34,9% et 30%) à 72h par rapport au témoin négatif qui est les cellules B naïves non activées (2,5%, 9,1% et 3,6%) (Figure 32).

Nous pouvons conclure, que les cellules B humaines peuvent être aussi activées en utilisant le cocktail utilisé par l'équipe de Fraser (Osborne et *al*., 2007).

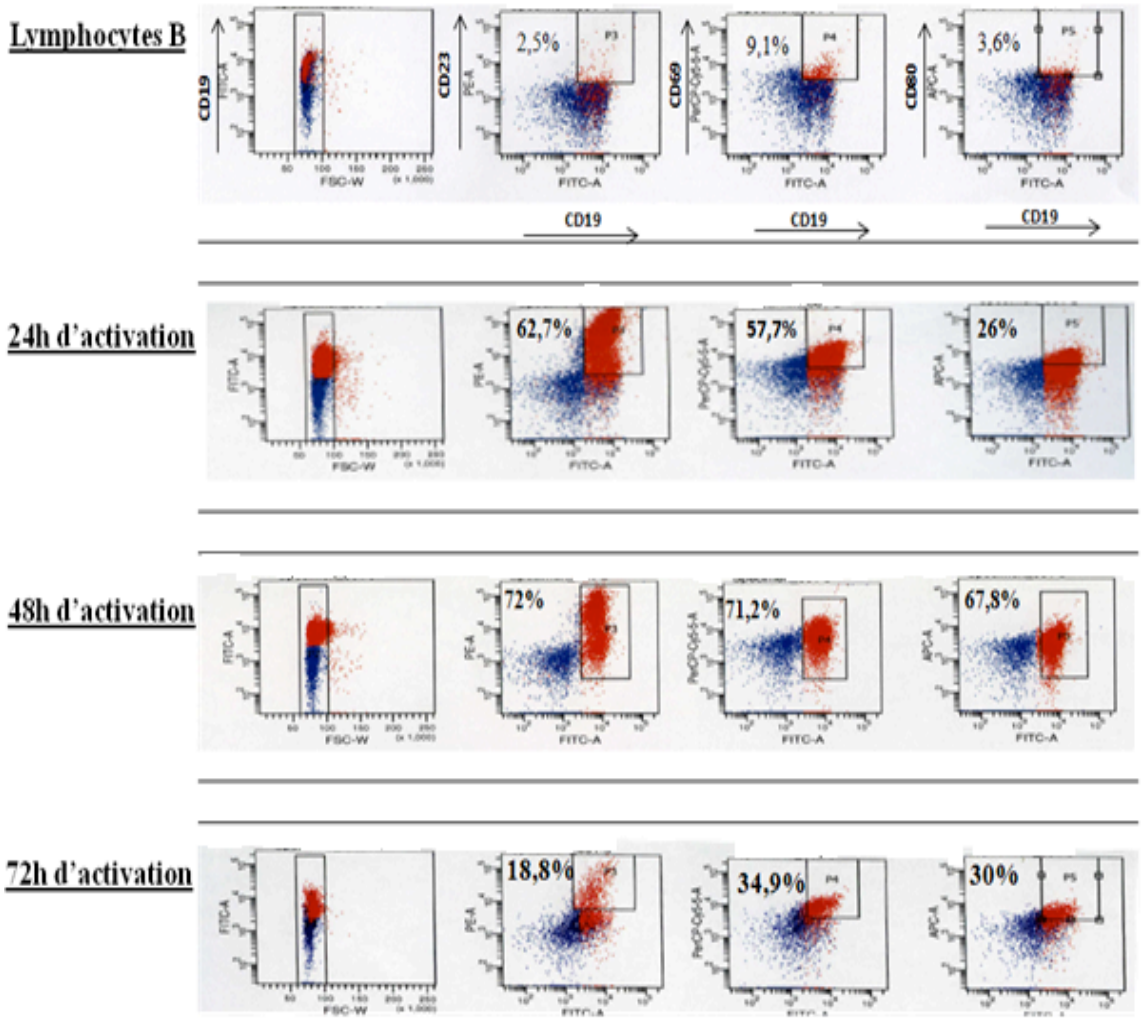


Figure 32. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire CD19, CD23, CD69 et CD80 par cytométrie en flux des lymphocytes B non activés ou naïfs (Lymphocytes B) et les lymphocytes B durant une cinétique d'activation par anti-IgM, anti-CD40 et IL4 (24h, 48h et 72h).

2.2. Modification de la distance radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B humains activés

Après vérification de l'activation des cellules B par FACS, nous avons fixé les lymphocytes B des différentes conditions (0h, 24h, 48h et 72h). Ensuite nous les avons hybridés, par la méthode de FISH en 3D, avec deux sondes spécifiques des loci *IGH* et *CMYC*. Les images obtenues par microscopie confocale ont été analysées par le logiciel.

Nous avons analysé la distance radiale des allèles au cours de la cinétique d'activation par les cytokines. Pour cette partie, nous avons analysé 273 noyaux à 0h, 187 noyaux à 24h, 140 noyaux à 48h et 156 noyaux à 72h.

Nos résultats montrent une délocalisation du locus *CMYC* vers le centre du noyau seulement à 24h après activation. En revanche, le locus *IGH* reste stable durant toute la cinétique d'activation (voir Figure 33).

L'activation des lymphocytes B humains par le cocktail induit une délocalisation ponctuelle (à 24h après activation) du locus *CMYC* vers le centre du noyau du côté du locus *IGH*.

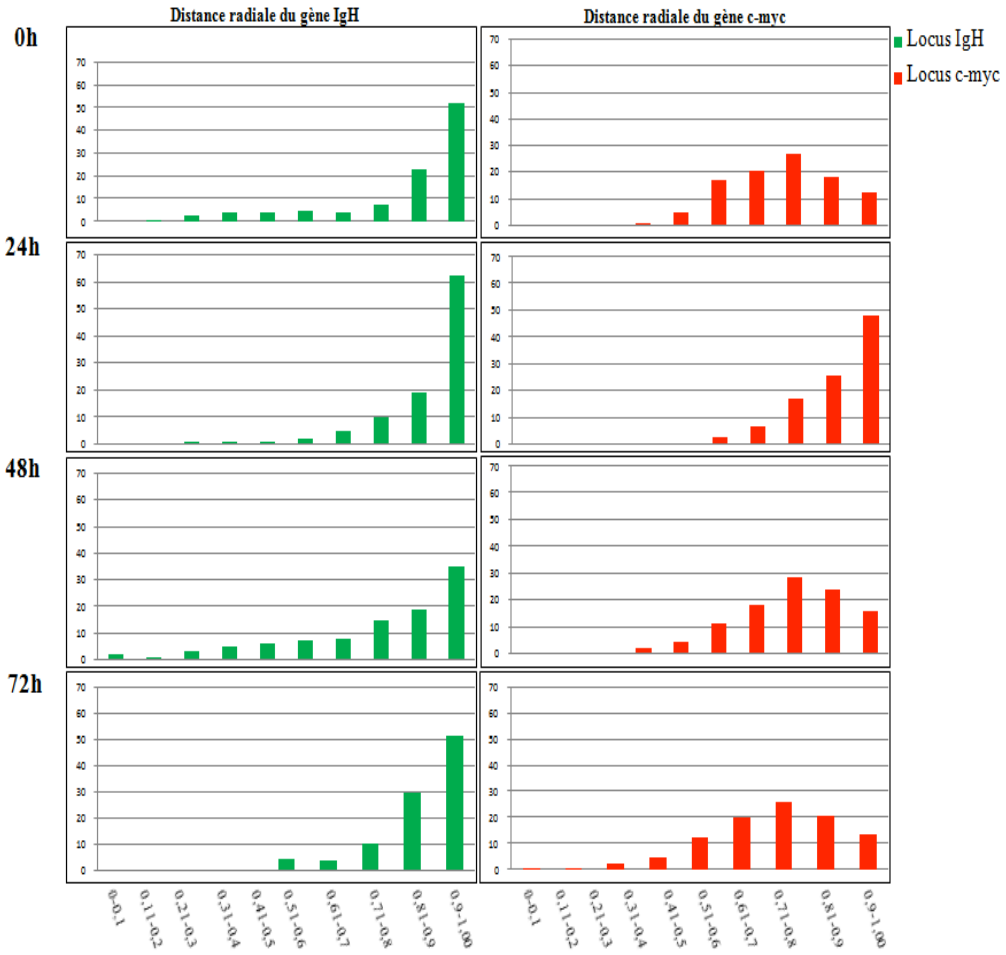


Figure 33. Analyse de la répartition radiale des allèles *IGH* (en vert) et *CMYC* (en rouge) dans les noyaux des lymphocytes B naïfs (0h) et durant une cinétique d'activation par l'anti-IgM, anti-CD40 et IL4 (24h, 48h et 72h) (mesures normalisées). Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 187 à 24h, 140 à 48h et 156 à 72h. La distance théorique est indiquée en abscisse et le pourcentage de signaux observés pour chaque position en ordonnée.

2.3. L'activation des lymphocytes B naïfs humains induit une colocalisation précoce et ponctuelle des loci *IGH* et *CMYC*

Nous avons aussi étudié la colocalisation entre les deux loci *IGH* et *CMYC* durant la cinétique d'activation. Les résultats révèlent une augmentation très significative (Pval=2,85x10^{-50}) à 24h après activation du nombre de colocalisation entre *IGH* et *CMYC* (38,5%) par rapport aux lymphocytes B non activés (4,7%). Après 48H et 72h d'activation nous marquons une baisse du nombre de colocalisation par rapport à 24h (10,7% et 10,2%) mais ceci reste très significatif (pval= 0,00056 et 0,00061) par rapport à notre témoin négatif (Figure 34).

L'activation des lymphocytes B humains par les cytokines est capable de stimuler la prolifération des lymphocytes B naïfs et d'induire momentanément (seulement à 24h) le rapprochement entre les gènes *IGH* et *CMYC*.

D'après les résultats de l'équipe de Fraser, l'activation des lymphocytes B de souris par les cytokines provoque la surexpression du gène *CMYC* en plus de sa colocalisation avec *IGH*. Est-ce que l'activation des cellules B humaines augmenterait aussi la surexpression du gène *CMYC* ?

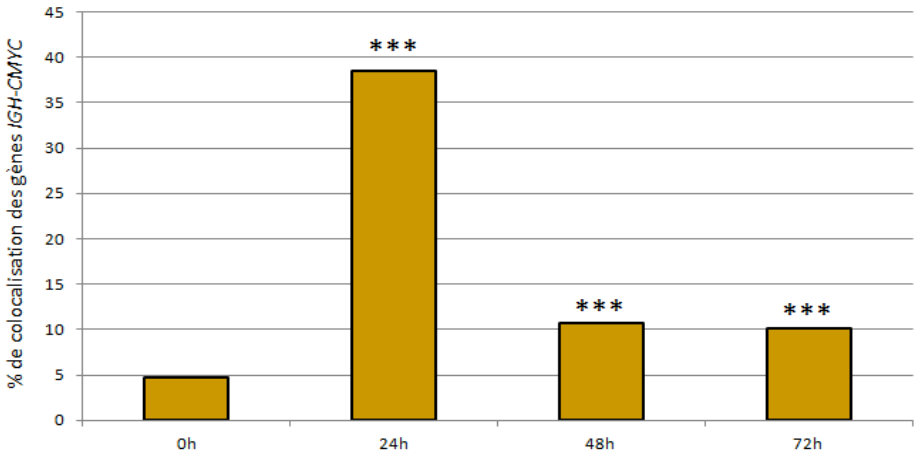


Figure 34. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés.
Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans les lymphocytes B naïfs (0h) et durant la cinétique d'activation des lymphocytes B par le cocktail suivant anti-IgM, anti-CD40 et IL4 (24h, 48h et 72h). *** : p<0,001 ; ** : 0,001<p<0,01 ;* : 0,01<p<0,5 ; ns : non statistiquement significatif (p>0,05). Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 187 à 24h, 140 à 48h et 156 à 72h.

2.4. Activation des lymphocytes B in vitro et surexpression du gène *CMYC*

Des travaux de Peter Fraser ont montré que l'activation in vitro des lymphocytes B des souris peut induire la délocalisation des gènes *IGH* et *CMYC*, l'augmentation de leurs colocalisations et la surexpression du gène *CMYC* (Osborne et *al*., 2007). Dans le but de vérifier l'expression du gène *CMYC* mais cette fois ci sur les lymphocytes B humains activés, nous avons extrait les ARN totaux des cellules B activées (24h, 48h et 72h) et non activées et une rétrotranscription en ADNc a été effectuée pour évaluer le niveau d'expression des gènes voulus par qPCR. L'expression du *GAPDH* « gène de ménage » a également été quantifiée, afin de pouvoir normaliser les résultats obtenus.

Les résultats montrent une augmentation significative (pval=0,0027) de l'expression de *CMYC* au bout de 24h d'activation des cellules par rapport à notre contrôle : cellules non activés (les lymphocytes B naïfs). En revanche à 48h et 72h après activation on détecte une baisse du niveau d'expression de *CMYC* par rapport à 24h comme ceci est montré sur le graphe (Figure 35).

L'activation des lymphocytes B montre une augmentation précoce et ponctuelle de la colocalisation *IGH-CMYC* et l'expression du gène *CMYC*.

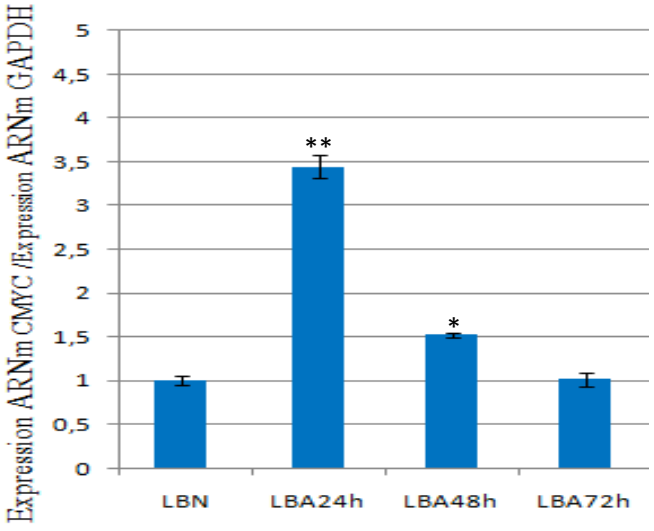


Figure 35. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B activés et non activés.

Est-ce que le virus EBV qui est capable d'infecter et activer les lymphocytes B, peut induire la réorganisation nucléaire dans les noyaux des lymphocytes B et par la suite la colocalisation d'*IGH* et *CMYC* ?

3. Position des loci *IGH* et *CMYC* après infection des lymphocytes B naïfs par l'EBV

Le virus EBV est associé dans 95% des cas au BL de type endémique. En plus de son pouvoir infectieux pour les lymphocytes B, EBV est capable de les immortaliser (Kieff E et *al*., 1990). Des travaux ont montré que l'infection des lymphocytes B humains induit la délocalisation des chromosomes 17 et 18 de tailles et de compositions en gènes différentes (Li et *al*., 2010). En se basant sur ces résultats, nous nous sommes alors demandés si l'infection virale des lymphocytes B naïfs par EBV pourrait rapprocher les deux loci *IGH* et *CMYC* et par la suite favoriser leurs translocations et augmenter les risques de déclencher un BL.

Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une cinétique d'infection des lymphocytes B naïfs par le surnageant viral EBV (0h, 24h, 48h et 72h) (cette partie a été décrite dans matériel et méthode : Infection des lymphocytes B par EBV). De la même manière que pour l'étude de la position des loci *IGH* et *CMYC* dans la première partie, les lymphocytes ont été hybridés, par la méthode de FISH en 3D, avec deux sondes spécifiques aux loci *IGH* et *CMYC*. Les images obtenues par microscopie confocale ont été analysées par notre logiciel.

3.1. Infection des lymphocytes B par EBV et modification de la distance radiale des loci *IGH* et *CMYC*

Afin de déterminer la localisation tridimensionnelle des gènes dans les noyaux avant et après infection par EBV, nous avons évalué la distance radiale de chaque allèle *IGH* et *CMYC* dans les différents noyaux analysés.

Les résultats obtenus après analyse par le logiciel montrent une délocalisation du locus *CMYC* vers le centre du noyau à proximité du locus *IGH* dans les lymphocytes B infectés par EBV (48h et 72h) par rapport aux lymphocytes B témoins (0h). En revanche, 24h après infection nous n'avons enregistré aucune modification de la localisation radiale du locus *CMYC*. Le locus *IGH* n'est pas influencé par l'infection virale et garde une position stable avant et après infection.

Nous constatons que l'infection virale par EBV, induit un effet tardif et maintenu dans le temps sur la délocalisation du locus *CMYC* vers le centre du noyau par rapport à l'activation par les cytokines (Figure 36).

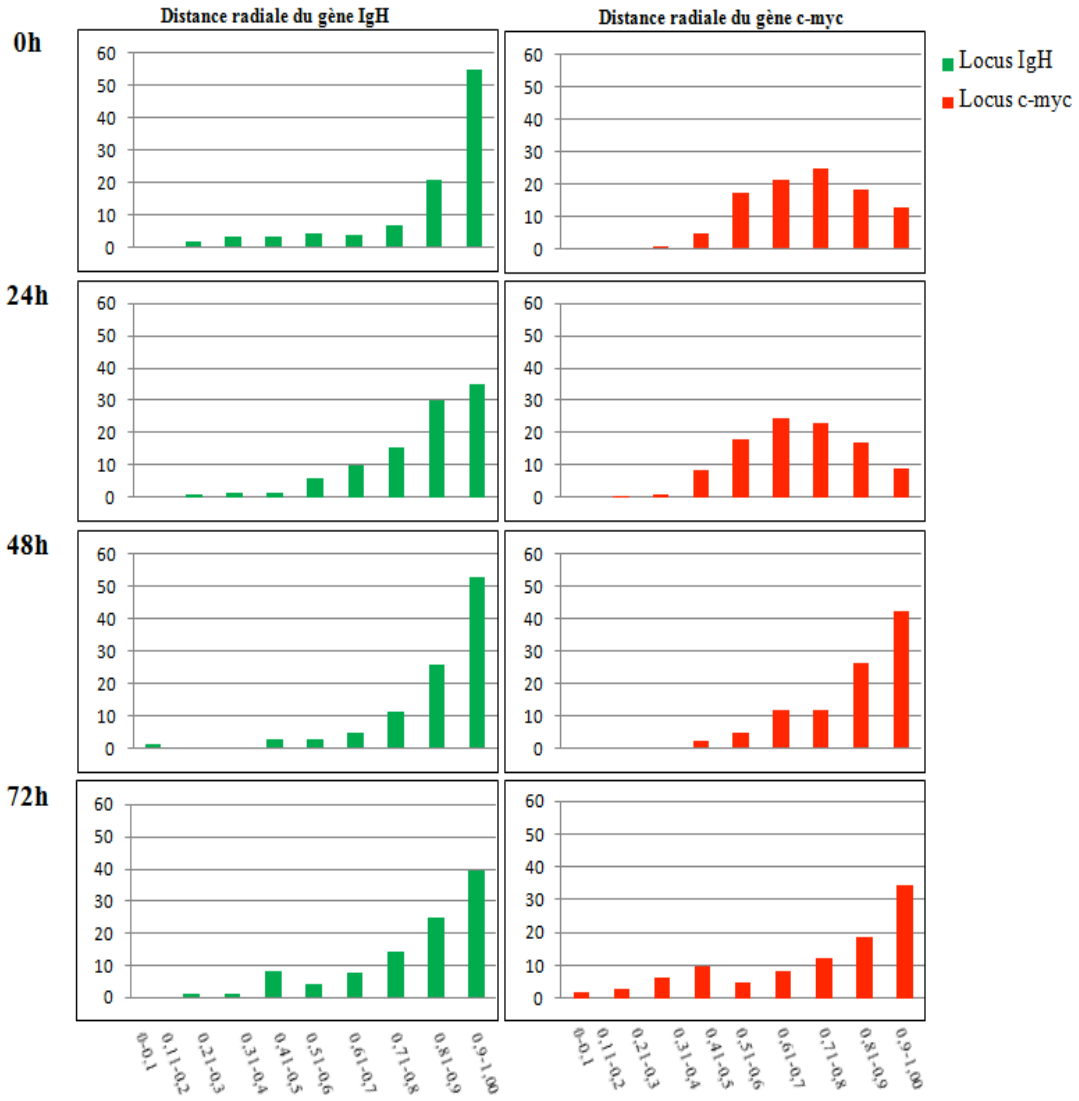


Figure 36. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* (en vert) et *CMYC* (en rouge) dans les noyaux des lymphocytes B naïfs non infectés (0h), et les noyaux des lymphocytes B durant une cinétique d'infection par EBV (24h, 48h et 72h) (mesures normalisées). La valeur 0 détermine la périphérie du noyau alors que 1 constitue le centre du noyau. En ordonnées : pourcentage des signaux et en abscisse : distance théorique. Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 166 à 24h, 109 à 48h et 100 à 72h.

3.2. Colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B infectés par EBV

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'analyse des colocalisations *IGH-CMYC* après infection par EBV. Nous avons analysé pour cette étude 273 noyaux à 0h, 166 noyaux à 24h, 109 noyaux à 48h et 100 noyaux à 72h. Nous avons observé une augmentation significative (pval= 0,0028) du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* au bout de 24h d'infection des lymphocytes B par EBV (la valeur de cette augmentation étant de 10,24%) par rapport au témoin. Cette augmentation est beaucoup plus prononcée après 48h et 72h d'infection par EBV (32,11% et 34,48%). La colocalisation viro-induite des gènes d'intérêt est statistiquement très significative (pval 48h= $6{,}713 \times 10^{-10}$ et pval 72h= $2{,}882 \times 10^{-10}$). L'infection par EBV montre une augmentation croissante du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* en fonction du temps. En revanche, dans la lignée immortalisée par EBV (LCL) notre contrôle positif, le nombre de colocalisation *IGH-CMYC* chute jusqu'à (9,41%) par rapport à 48h et 72h après infection (Figure 37).

Cette analyse montre que l'implication de l'infection des lymphocytes B par EBV sur la délocalisation du gène *CMYC* et sa colocalisation avec *IGH* est beaucoup plus important et efficace que celui de l'activation avec les cytokines. Ces résultats montrent que l'activation n'est pas le seul mécanisme responsable de la réorganisation nucléaire et le réarrangement génique.

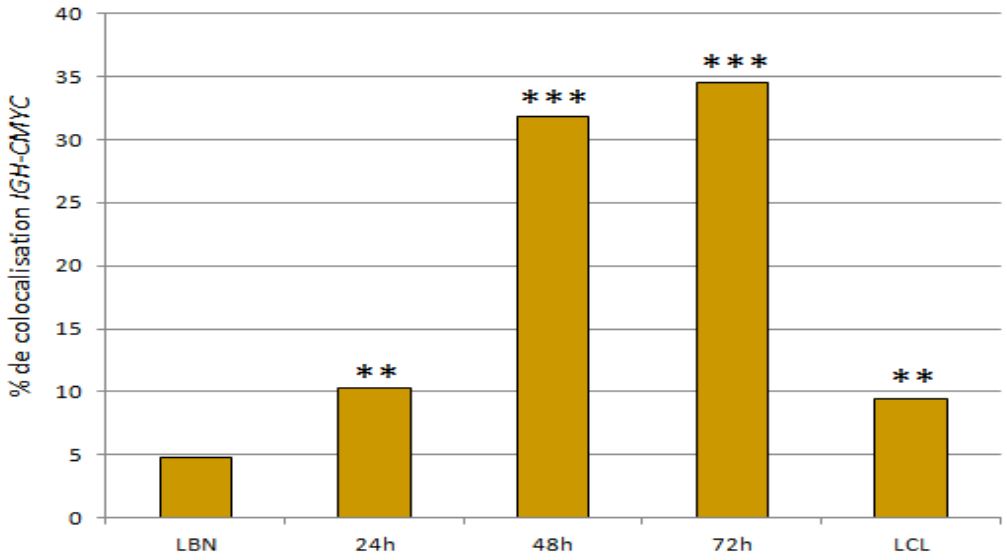


Figure 37. Pourcentage des signaux *IGH* et *CMYC* colocalisés.
Les signaux *IGH* et *CMYC* dont la distance qui les sépare est ≤ à 1µm sont considérés comme colocalisés. Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans des lymphocytes B naïfs (LBN) non infectés, 24h, 48h, 72h après infection par EBV et dans la lignée lymphoblastoïde immortalisée par EBV : RPMI 8866 (LCL). Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 166 à 24h, 109 à 48h, 100 à 72h et 170 pour les LCLs. *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

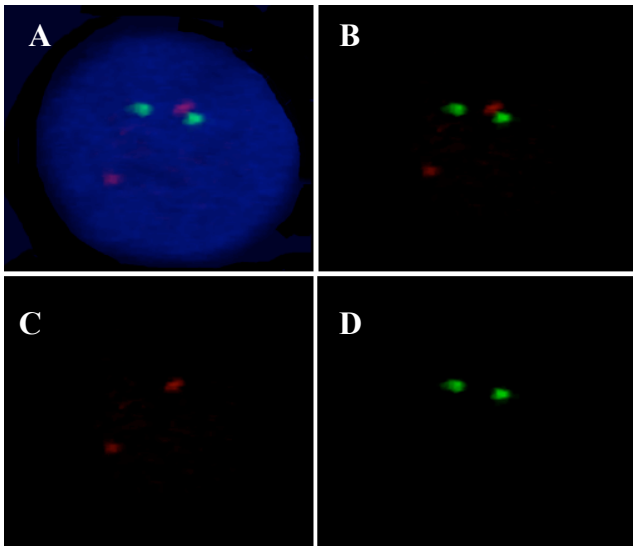


Figure 38. Exemple de FISH en 3D sur un noyau de lymphocyte B infecté par EBV présentant une colocalisation *IGH-CMYC*. Projections en Z de tous les plans de piles d'images de microscopie confocale. (A) image triplement marquée (*IGH*, *CMYC* et noyau) avec présence de colocalisation de *IGH* et *CMYC*, le noyau est marqué à l'aide du To-PRO3 visible en bleu sur ces images (B) merge des deux loci *IGH* et *CMYC*. (C) le locus *CMYC* en rouge (sonde couplée au spectrum Orange). (D) le locus *IGH* apparait en vert (sonde couplée au spectrum Green).

Qu'elle alors la conséquence de l'infection virale sur la dérégulation de l'expression du gène *CMYC* ?

3.3. Infection des lymphocytes B par EBV et surexpression du gène *CMYC*

Dans le but de vérifier l'effet de l'infection par EBV sur l'expression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B humains. Nous avons quantifié par qPCR le niveau d'expression du gène *CMYC* et *GAPDH* « gène de ménage » dans les noyaux des lymphocytes B durant la cinétique d'infection par EBV.

Les résultats révèlent une faible modification de l'expression de *CMYC* au cours de l'infection des lymphocytes B. En effet, on remarque une augmentation significative (pval=0,0422) de l'expression du gène *CMYC* seulement à 72h par rapport au témoin négatif (Figure 39).

En conclusion pour cette partie, l'infection virale par EBV et l'activation par les cytokines ne nous permettent pas d'obtenir les mêmes résultats. L'infection virale par EBV est beaucoup plus impliquée dans l'augmentation de la colocalisation que l'activation par le cocktail. En effet, nous savons déjà que la proximité prolongée des loci *IGH* et *CMYC* augmente la probabilité de leurs translocation et le déclenchement d'un BL.

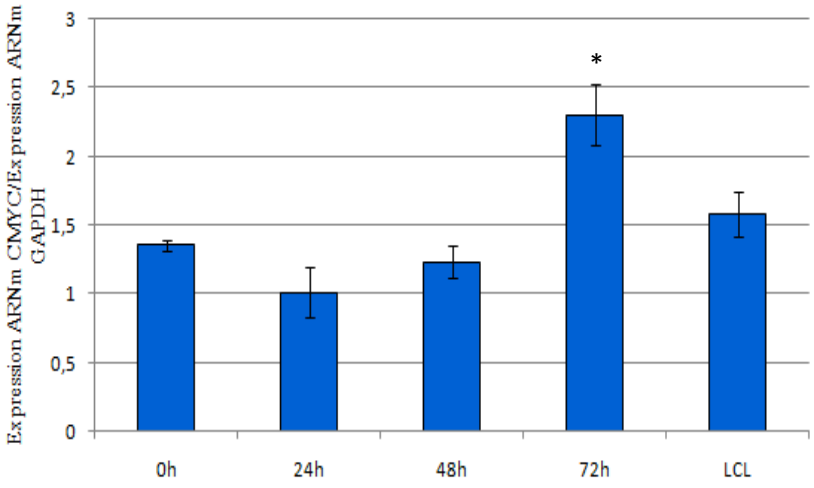


Figure 39. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B infectés par EBV (24h, 48h et 72h), non infectés (0h) et la lignée immortalisée par EBV (LCL).

Nous nous sommes demandés si l'effet observé est spécifique du virus EBV ?

4. Position des loci *IGH* et *CMYC* après incubation des lymphocytes B naïfs avec le VIH-1

Le VIH-1 constitue le deuxième virus d'intérêt dans nos études car comme l'EBV il est associé au BL. En effet, il a été montré que ce virus est capable de stimuler les lymphocytes B naïfs via l'interaction gp120 (récepteurs du VIH-1) et CD21 (ou CR2 des LBN) (Malaspina et *al*., 2002). La question que nous posons alors, est de savoir si la stimulation ou le contact du virus VIH-1 avec les lymphocytes B naïfs modifie aussi l'organisation des gènes *IGH* et *CMYC* impliqués dans le déclenchement du BL.

Afin de répondre à cette question nous avons procédé de la même manière que pour l'étude de l'EBV.

4.1. Incubation des lymphocytes B avec le VIH-1 et modification de la localisation radiale des loci *IGH* et *CMYC*

L'étude de la distance radiale de gènes *IGH* et *CMYC,* au cours de la cinétique d'incubation avec le surnageant VIH-1 nous révèle une délocalisation des allèles *CMYC* vers le centre du noyau à proximité des loci *IGH* à partir de 48h (Figure 40). Les résultats révèlent une stabilité de la position du gène *IGH* qui occupe, quelles que soient les cellules analysées, le centre du noyau.

Comme l'EBV, le VIH-1 a donc un effet différent de celui induit par l'activation.

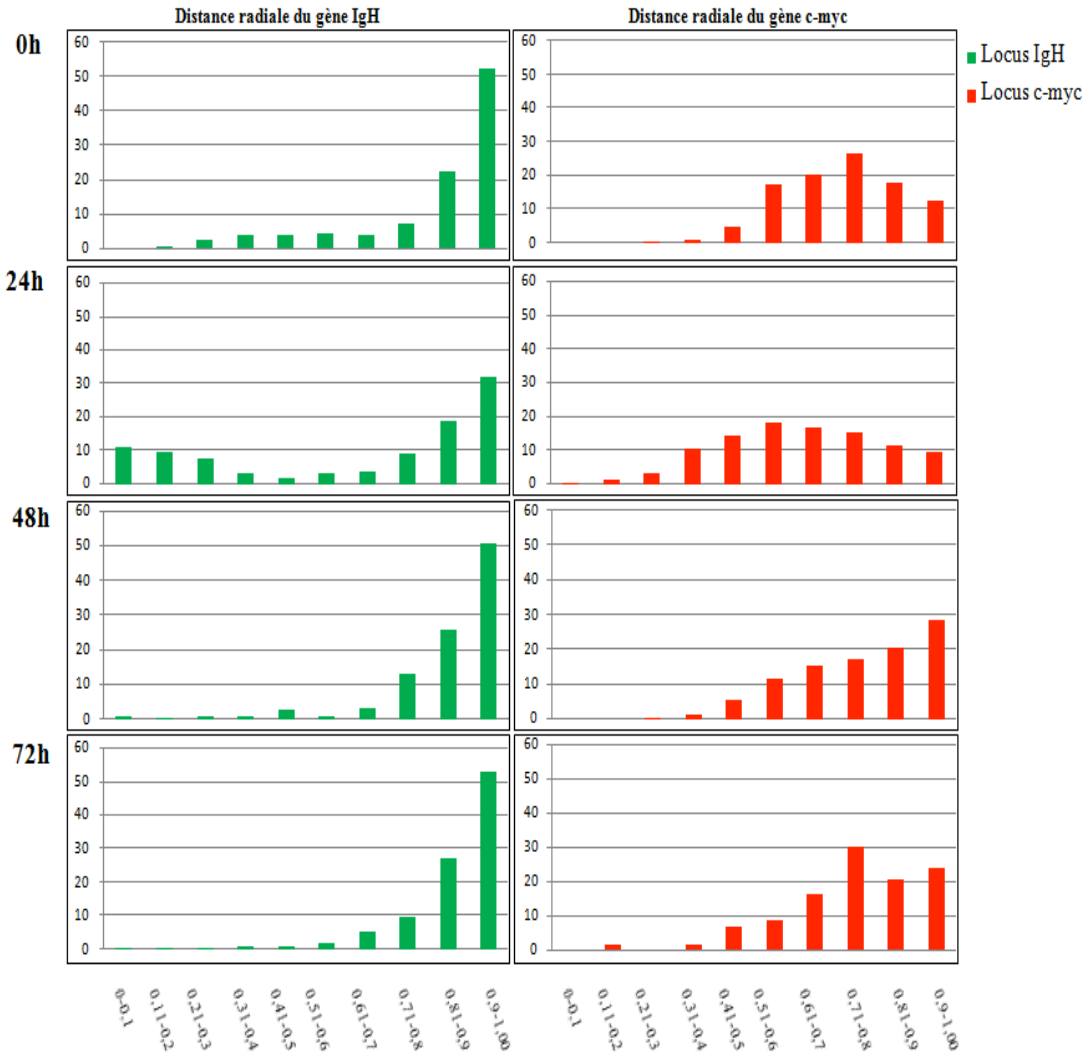


Figure 40. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* (en vert) et *CMYC* (en rouge) dans les noyaux des lymphocytes B naïfs (0h), et les noyaux des lymphocytes B durant une cinétique d'incubation avec le surnageant viral HIV-1 (24h, 48h et 72h) (mesures normalisées). En abscisse : pourcentage des signaux et en ordonnées : distance théorique. Pour chaque échantillon, Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 241 à 24h, 151 à 48h et 184 à 72h.

4.2. Augmentation du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B incubés avec le VIH-1

Nous avons réalisé une cinétique d'incubation des lymphocytes B naïfs avec le surnageant viral VIH-1 (0h, 24h, 48h et 72h). Au début nous nous sommes intéressés à l'étude de la distance entre les différents gènes hétérologues de chaque noyau. Cette distance intergénique nous permet de déterminer le pourcentage de colocalisation au cours de la cinétique d'infection par le VIH-1.

Les résultats montrent une faible augmentation statistiquement significative (Pval= 0,09) du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* (24h) (7%) après incubation avec le surnageant viral VIH-1 par rapport au témoin négatif qui est les lymphocytes B naïfs (0h) (4%). Par contre à 48h nous remarquons une augmentation très significative du nombre de colocalisation d'*IGH-CMYC* (27%) (Pval=1,28 10^{-22}). Au bout de 72h d'incubation avec le surnageant VIH-1 nous retrouvons toujours cette augmentation de colocalisation des gènes d'intérêt mais ceci reste moins important par rapport à la valeur mesurée à 48h (14%) (Figure 41). Les résultats obtenus avec le surnageant viral VIH-1 sont semblables aux résultats obtenus avec l'EBV.

L'activation des lymphocytes B via le cocktail est impliquée dans l'augmentation des colocalisations *IGH-CMYC* mais elle n'est probablement pas responsable de la translocation chromosomique. En effet, la translocation nécessite une proximité prolongée entre les deux loci 8q24 et 14q32. Les virus EBV et VIH-1 semblent dans ce cas avoir un rôle plus important dans la translocation t(8;14) et dans le déclenchement du BL.

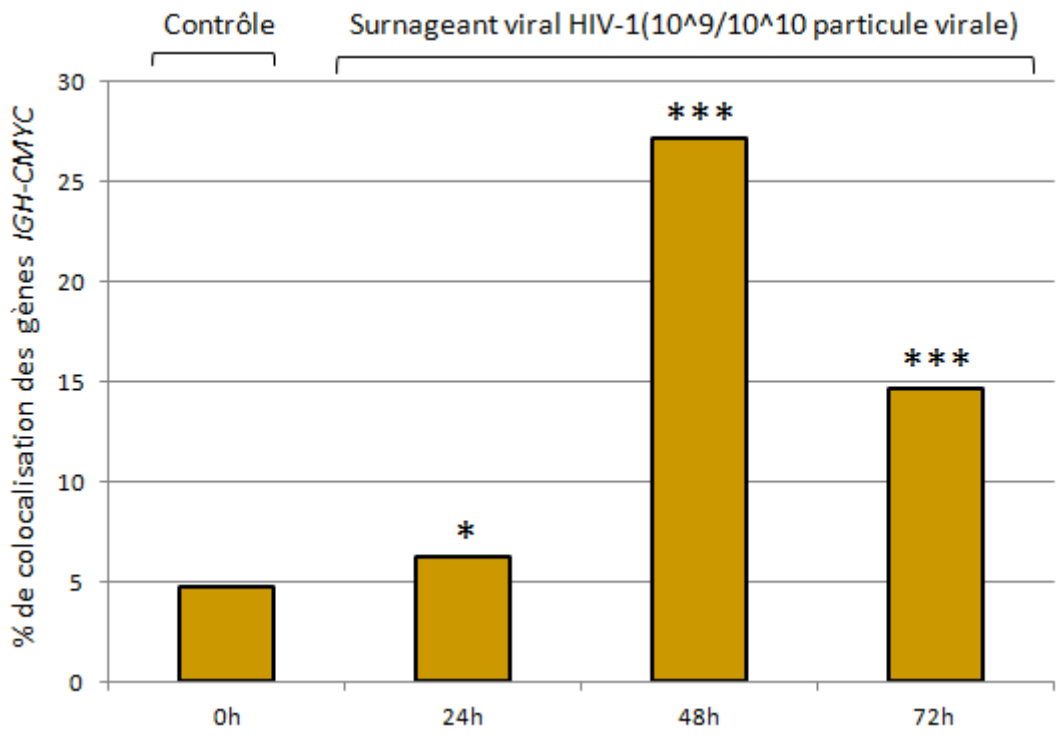


Figure 41. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés.
Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans les lymphocytes B naïfs (0h) le contrôle négatif et durant une cinétique d'incubation des lymphocytes B par le surnageant viral VIH-1. Pour chaque échantillon, Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 241 à 24h, 151 à 48h et 184 à 72h. *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

Le rôle du virus VIH-1 est plus important que le rôle de l'activation par les cytokines dans la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC*. Afin de vérifier ce résultat nous avons voulu étudier l'effet du VIH-1 sur l'activation des lymphocytes B ?

4.3. Activation des lymphocytes B par le VIH-1

Des études ont montré la capacité du VIH-1 à activer les lymphocytes B grâce à l'interaction de son récepteur gp120 avec celui des lymphocytes B le CD21 (Malaspina et *al*., 2002). Nous avons donc voulu étudier l'effet du VIH-1 sur la stimulation des lymphocytes B naïfs. Pour cela nous avons marqué les lymphocytes B incubés avec VIH-1 à l'aide des anticorps suivants : anti-CD19, anti-CD23, anti-CD69 et anti-CD80. Nous avons enregistré une activation des lymphocytes B seulement 24h après incubation avec le surnageant viral VIH-1.

L'interaction entre le VIH-1 et les lymphocytes B induit une activation précoce mais ponctuelle des lymphocytes B comme mis en évidence dans la figure ci-dessous (Figure 42).

L'activation des lymphocytes B humains par le virus VIH-1 est beaucoup moins importante et efficace que l'activation induite par les cytokines. Ceci confirme donc le rôle minoritaire de l'activation dans la délocalisation du locus *CMYC* et sa colocalisation avec *IGH*.

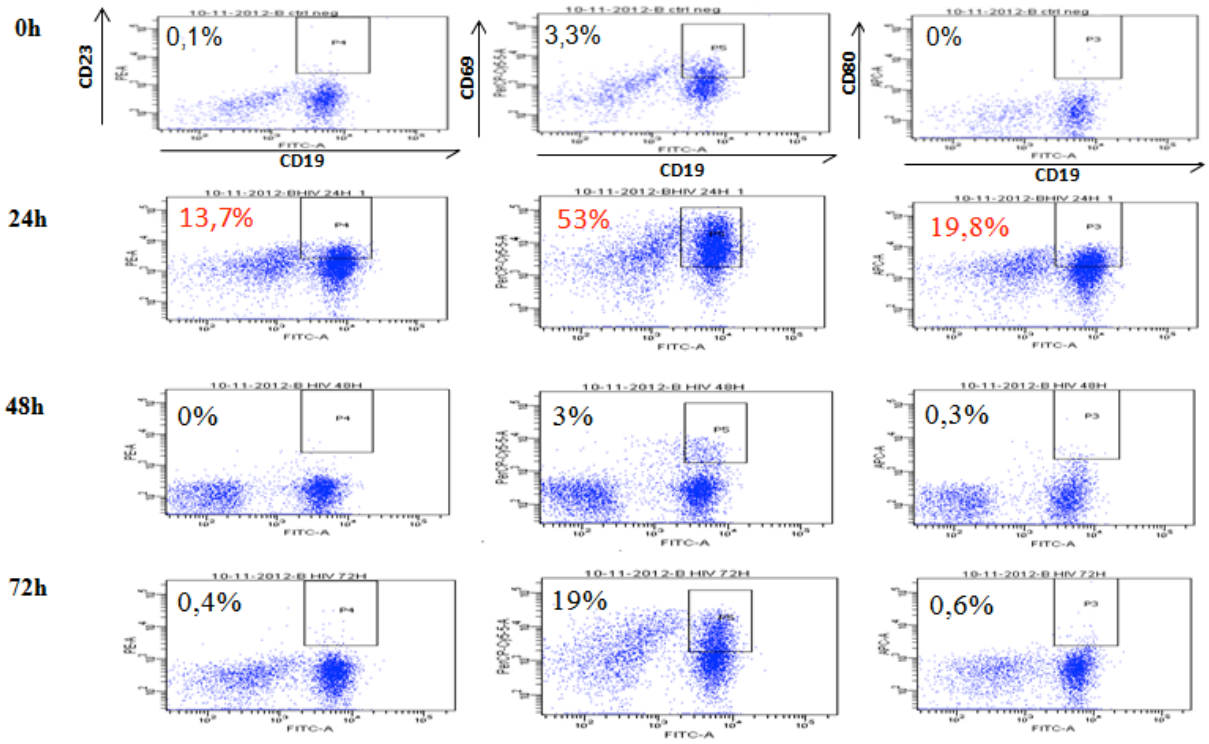


Figure 42. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire CD19, CD23, CD69 et CD80 par cytométrie en flux des lymphocytes B durant une cinétique d'incubation avec le surnageant viral VIH-1(24h, 48h et 72h).

4.4. Incubation des lymphocytes B avec le VIH-1 et surexpression du gène *CMYC*

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de la délocalisation du gène *CMYC* et l'activation des lymphocytes B sur la variation de l'expression du gène *CMYC*.

Les ARN totaux des cellules B incubées avec le surnageant viral VIH-1 (24h, 48h et 72h) et non incubées (0h) sont extraits. L'expression du gène *CMYC* est quantifiée. Nous avons également quantifié l'expression du *GAPDH* « gène de ménage » afin de pouvoir normaliser les résultats obtenus. Les analyses des résultats de la qPCR montrent une augmentation très significative (pval= 0,0064) du niveau de transcription de *CMYC* de l'ordre de 10 fois dans les lymphocytes B incubés 24h avec le VIH-1 et 4 fois dans les lymphocytes incubés 72h avec le virus par rapport aux cellules témoins (LBN) (Figure 43). Le virus VIH-1 est aussi capable de délocaliser et de surexprimer le gène *CMYC*.

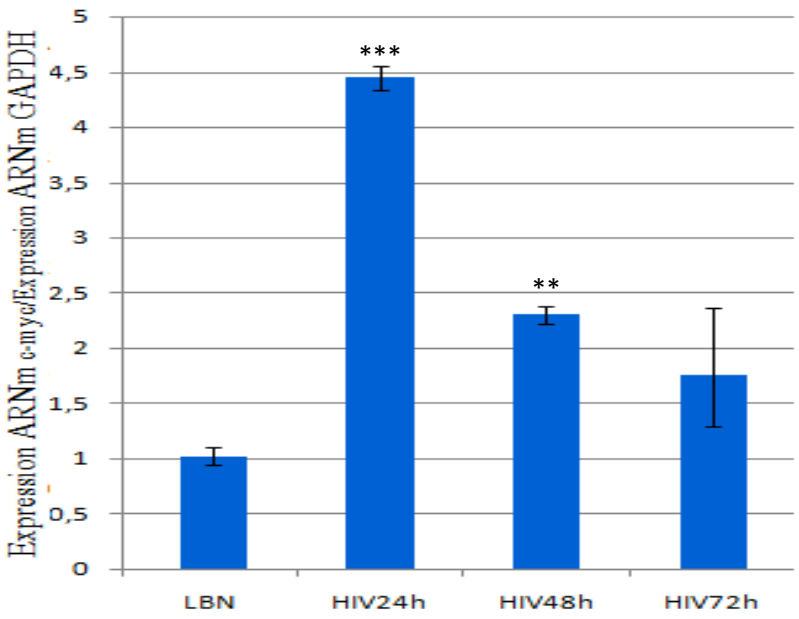


Figure 43. Analyse par RT-PCR quantitative de l'ARNm de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B naïfs (LBN) et durant une cinétique d'incubation avec le surnageant viral VIH-1.

Dans le chapitre qui suit, nous avons étudié l'implication éventuelle d'un récepteur membranaire ou d'une protéine virale dans cette délocalisation et surexpression de *CMYC* : gp120 (récepteur VIH-1) et Tat-VIH-1.

5. Position des loci *IGH* et *CMYC* après infection des lymphocytes B naïfs par le surnageant viral VIH-1 déplété de son gp120

L'interaction entre les récepteurs gp120 (récepteur viral du VIH-1) et CD21 (récepteur des lymphocytes B) est responsable de la stimulation des lymphocytes B. Afin de savoir si cette interaction est responsable de la délocalisation de l'oncogène *CMYC* vers le locus *IGH*, nous avons utilisé un virus VIH-1 muté qui n'exprime par le récepteur gp120 à sa surface (delta gp120).

5.1. Le récepteur gp120 n'intervient pas dans la colocalisation *IGH-CMYC*

Nous avons réalisé une cinétique d'incubation des lymphocytes B naïfs avec le surnageant viral VIH-1delta gp120 (0h, 24h, 48h et 72h). Les résultats de mesure des distances entre les gènes *IGH* et *CMYC* dans les noyaux analysés, montrent une augmentation très significative (pval=10^{-9}) du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* à 48h (29%) (Figure 44).

L'interaction gp120 et CD21 n'est pas responsable de la délocalisation et la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC*. Ce résultat confirme aussi que l'activation des lymphocytes B n'est pas le mécanisme responsable d'un tel effet.

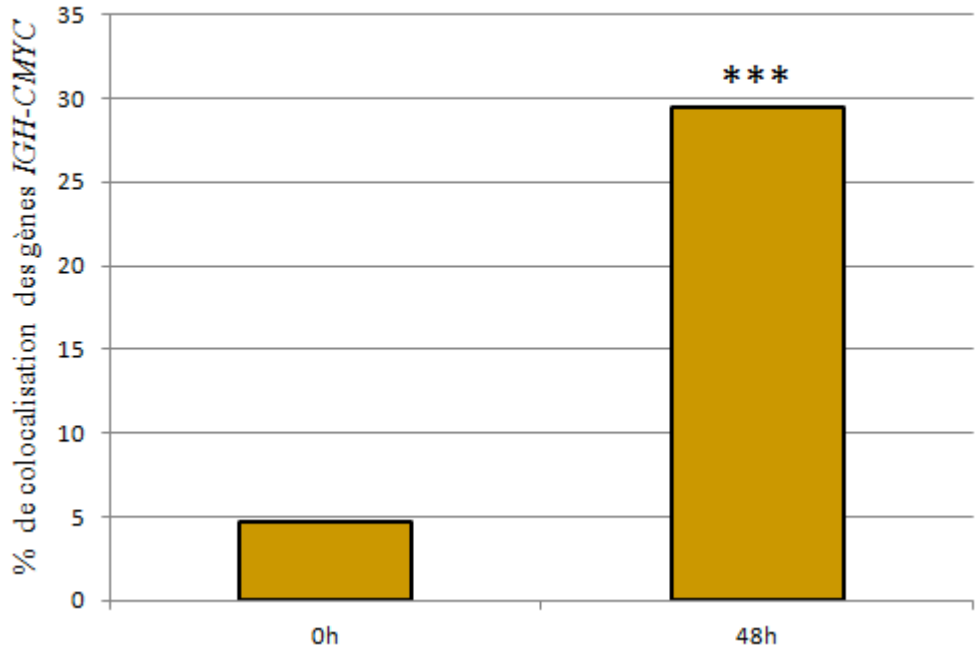


Figure 44. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés. Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans les lymphocytes B naïfs (0h) le contrôle négatif et durant 48h d'incubation des lymphocytes B par le surnageant viral HIV-1 dépourvu de son gp120. *** : p<0,001 ; ** : 0,001<p<0,01 ;* : 0,01<p<0,5 ; ns : non statistiquement significatif (p>0,05). Pour chaque échantillon, Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, et 112 à 48h *** : p<0,001 ; ** : 0,001<p<0,01 ;* : 0,01<p<0,5 ; ns : non statistiquement significatif (p>0,05).

Quel autre constituant du surnageant viral VIH-1 est responsable d'une telle modification ?

6. Position des loci *IGH* et *CMYC* après incubation des lymphocytes B naïfs par la protéine Tat

Nous avons choisi de tester le rôle de la protéine Tat dans la réorganisation génique, il a été démontré que 30% des souris Tat transgéniques développaient un lymphome de type B (Kundu et *al*., 1999). De plus, Tat-VIH-1 est capable de pénétrer par endocytose dans les cellules voisines infectées et non infectées et de moduler l'expression des gènes cellulaires en plus des gènes viraux (Sharma et *al*., 1995). Il a été aussi montré que Tat est responsable de la déficience dans la réparation des cassures de l'ADN (Nunnari et *al*., 2008). Ces arguments résumés (détaillés dans l'introduction dans la partie Tat et lymphomagenése), nous ont amené à choisir Tat-HIV-1 comme cible et à étudier son implication dans la délocalisation des gènes *IGH* et *CMYC*.

6.1. La protéine Tat recombinante seule induit la colocalisation *IGH-CMYC*

Pour cette étude nous avons réalisé une cinétique d'incubation des lymphocytes B naïfs avec la protéine Tat recombinante (0,25µg/1ml de milieu/1 million de lymphocyte B). De la même manière que précédemment, nous avons fixé et hybridé avec les deux sondes *IGH* et *CMYC*. L'analyse des distances entre gènes hétérologues révèlent une augmentation très significative du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* à (24h, 48h et 72h) après incubation avec la protéine recombinante Tat par rapport à celle observée pour les lymphocytes B non incubés (0h) (0h= 4,7%, 24h=16%, 48h= 36% et 72h=29%) (pval 24h=1,39 10^{-8}, pval 48h=6,16 10^{-23}et pval 72h=5,22 10^{-23}) (Figure 45).

La protéine Tat-VIH-1 est capable seule d'induire la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* avec une cinétique semblable à celle observé avec le surnageant viral VIH-1.

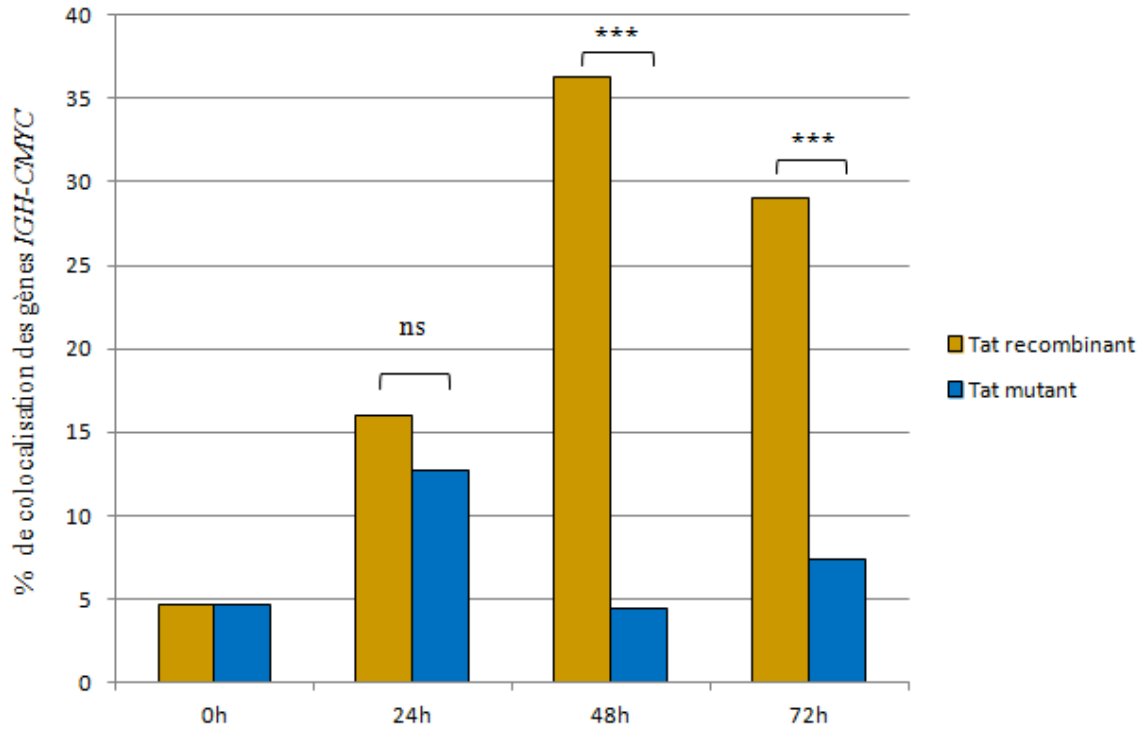


Figure 45. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés.
Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans les lymphocytes B naïfs (0h) le contrôle négatif, et durant la cinétique d'incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat recombinante et mutante C22 (24h, 48h et 72h). *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$). Pour la cinétique de Tat recombinante, nous avons réalisé une étude sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 144 à 24h, 91 à 48h et 155 à 72h et pour la cinétique de Tat mutante, nous avons analysé le nombre de noyau suivant : 273 à 0h, 141 à 24h, 179 à 48h et 81 à 72h *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

6.2. La protéine Tat-HIV-1 mutée (Tat-C22) n'induit pas la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC*

Il a été montré que la protéine Tat mutée au niveau des acides aminés de la région qui code pour la cystéine 22 inhibe totalement sa fonction de transactivation (Ruben et *al*., 1989). La protéine Tat-C22 perd sa fonction primordiale présente dans la protéine Tat normale.

Dans le but de confirmer le rôle de la protéine Tat-VIH-1 dans la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus *IGH* nous avons utilisé la protéine mutée C22 à la place de la protéine Tat-VIH-1 recombinante.

Pour cette étude nous avons réalisé une cinétique d'incubation des lymphocytes B naïfs avec la protéine Tat-C22 mutante, nous avons utilisé la même concentration utilisée précédemment avec la protéine Tat recombinante (0,25µg/1ml de milieu/1 million de lymphocyte B). Nous avons ensuite fixé et hybridé avec les deux sondes *IGH* et *CMYC*. L'analyse des distances entre gènes hétérologues montre un profil différent de celui obtenu avec la protéine Tat recombinante. En effet, à 24h, nous comptons une augmentation significative de colocalisations *IGH-CMYC* par rapport au contrôle (0h) (0h=4,7% et 24h=12,76%) (pval $=1,65x10^{-5}$). En revanche, nous ne marquons aucun changement du nombre de colocalisations *IGH* et *CMYC* à 48h et 72h après incubation avec la protéine mutante en comparaison avec le témoin non traité (pval 48h=0,7 et pval 72h=0,144) (Figure 45). La Tat mutante induit la colocalisation *IGH-CMYC* rapide mais non durable (très vite rétablie par la suite et retour à la valeur initiale).

Ces résultats montrent que la perte de la fonction principale (la transactivation des gènes viraux et cellulaires) de la protéine Tat par mutation de sa région Cystéine 22, inhibe son pouvoir de relocaliser l'oncogène *CMYC* à proximité du locus *IGH*. En revanche, la fonction de transactivation de Tat n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la colocalisation des gènes d'intérêts (nous avons obtenu une augmentation des colocalisations *IGH-CMYC* à 24h).

6.3. La protéine Tat modifie la localisation radiale des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des cellules B

Nous avons analysé les distances radiales des différents allèles *IGH* et *CMYC* durant la cinétique d'incubation avec la protéine Tat. Nous pouvons voir sur la figure au-dessous que le locus *CMYC* est délocalisé vers le centre du noyau à proximité du locus *IGH*. Le locus *IGH* est dans toutes les conditions, stable et toujours en position centrale (Figure 46).

Il semble donc que la protéine Tat joue un rôle dans la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus *IGH*.

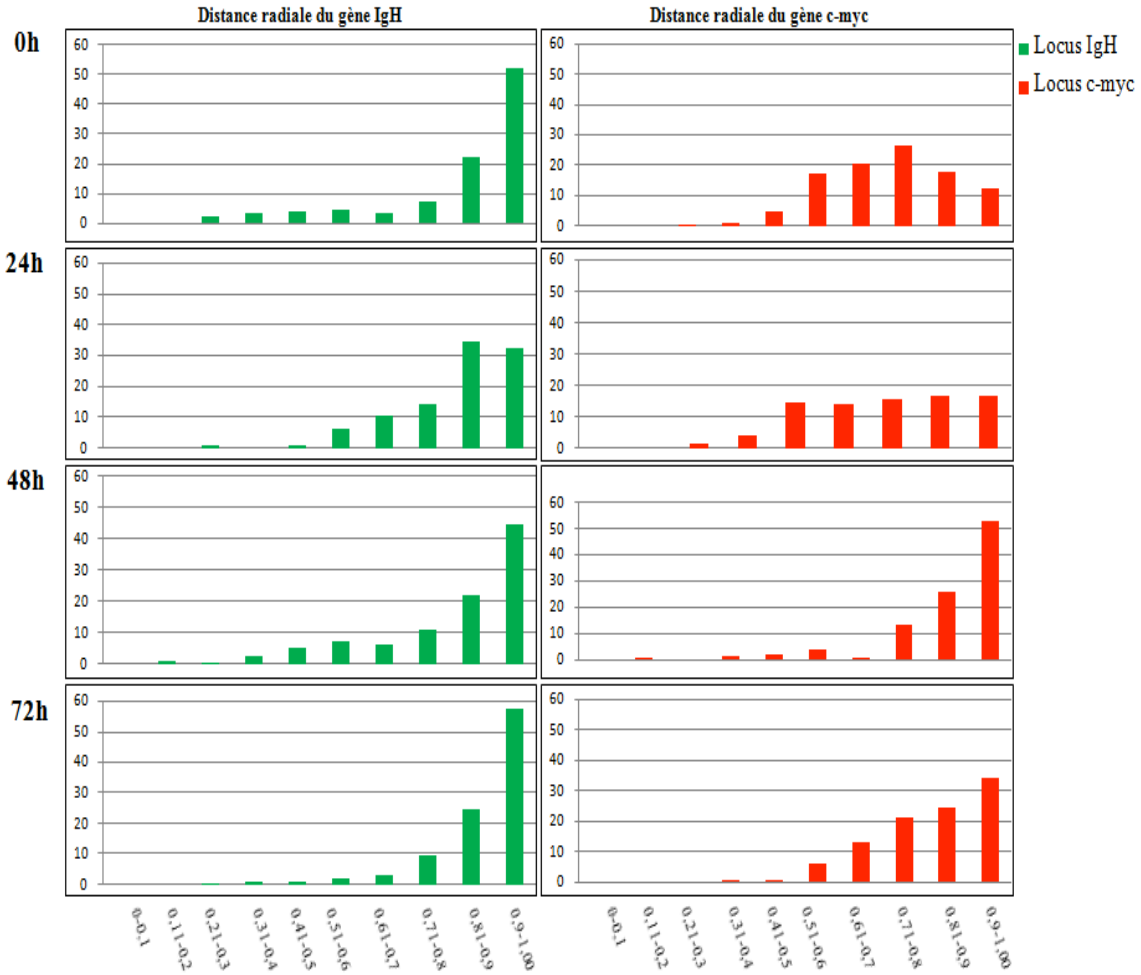


Figure 46. Analyse de la répartition radiale des gènes *IGH* (en vert) et *CMYC* (en rouge) dans les noyaux des lymphocytes B naïfs (0h), et les noyaux des lymphocytes B durant une cinétique d'incubation avec la protéine Tat recombinante (24h, 48h et 72h) (mesures normalisées). Abscisse : pourcentage des signaux et Ordonnées : distance théorique. Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 144 à 24h, 91 à 48h et 155 à 72h.

Tat induit-elle uniquement la délocalisation de *CMYC* en cible unique ou induit-elle la délocalisation concomitante d'autres gènes ?

6.4. Spécificité de l'action de la protéine Tat sur la délocalisation du gène *CMYC*

Afin de confirmer la spécificité de nos résultats, nous avons donc testé un gène autre que le gène *CMYC*. Nous avons donc choisi d'étudier la localisation du gène Beta-Globine avant et après incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat recombinante selon le même protocole expérimental précédemment énoncé (cinétique 0h, 24h, 48h et 72h). Nous avons

hybridé les cellules avec deux sondes Beta-Globine et *IGH*. Nous nous somme intéréssés à la distance qui sépare les deux loci Beta-Globine et *IGH* dans les différents noyaux analysés. L'analyse des mesures de distance entre les deux gènes montre une stablité de la localisation des loci Beta-Globine et *IGH* à (24h et 72h) (24h=5% et 72h=6%) par rapport au témoin (0h) (4%). En revanche, à 48h, nous avons détecté une faible mais significative augmentation du nombre de colocalisation Beta-Globine et *IGH* par rapport au témoin (0h=4% et 48h=8%) (Figure 47). Cette augmentation de la colocalisation Beta-Globine et *IGH* est negligeable par rapport à la colocalisation de *CMYC* vers *IGH* à 48h (36%).

L'effet de Tat sur la colocalisation de *CMYC* et *IGH* est beaucoup plus important que les effets observés sur la colocalisation Beta-Globine et *IGH*.

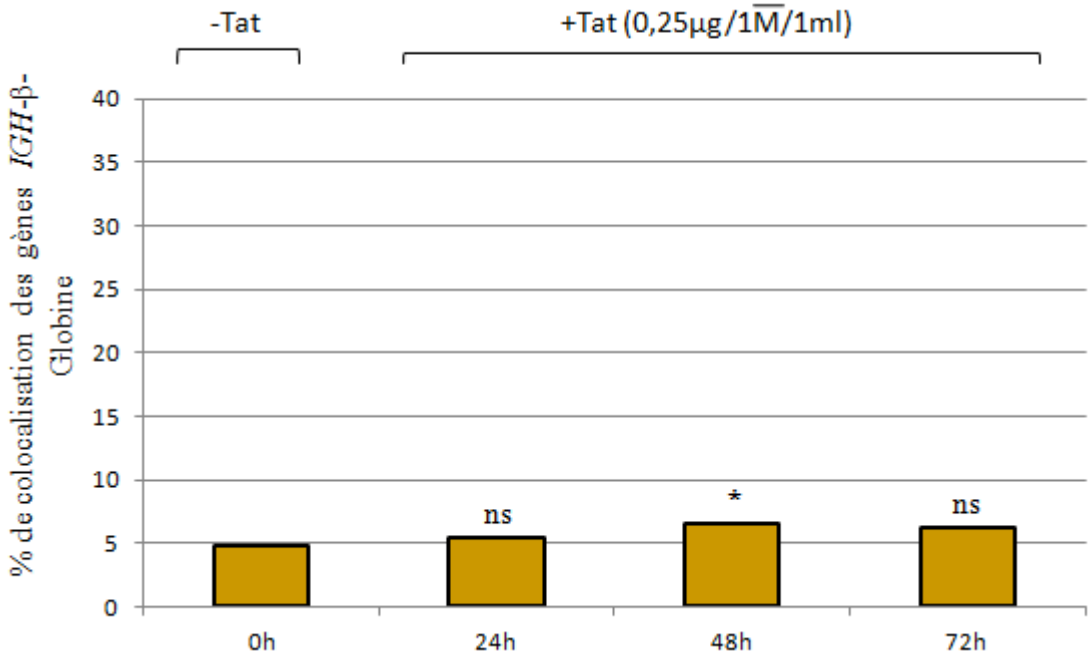


Figure 47. Pourcentage des signaux *IGH* et Beta-Globine colocalisés.
Les signaux *IGH* et Beta-Globine dont la distance qui les sépare est ≤ à 1µm sont considérés comme colocalisés. Le nombre de signaux colocalisé sa été comptabilisé dans des lymphocytes B naïfs (LBN) non traité avec Tat, et les lymphocytes B incubés 24h, 48h, 72h avec la protéine recombinante Tat. Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 83 à 0h, 90 à 24h, 90 à 48h et 80 à 72h *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

Afin de vérifier l'implication de la protéine Tat dans la réorganisation et le rapprochement des loci *IGH-CMYC* nous avons réalisé une série d'expérience : 1- Nous avons testé un mutant de

Tat (cf 6.2), 2- Nous avons déplété Tat du surnageant viral par immunoprécipitation, 2-Nous avons testé des concentrations différentes de Tat.

6.5. Inhibition du nombre des colocalisations *IGH-CMYC* après déplétion de la protéine Tat du surnageant viral VIH-1

Dans cette partie, nous avons voulu déterminer si la protéine Tat est le seul facteur responsable des modifications de l'organisation des gènes *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B ou c'est aussi l'effet d'un autre composant du surnageant viral VIH-1. Dans ce but, nous avons déplété la protéine Tat du surnageant viral grâce à la technique d'immunoprécipitation, exposée en détail dans le chapitre « matériels et méthodes » mais avec des précisions qui suivent. Nous avons incubé les lymphocytes B naïfs avec différentes conditions dans une plaques de 6 puits: 48h avec le surnageant viral VIH-1, 48h avec le surnageant viral VIH-1 déplété de sa protéine Tat, 48h avec le surnageant viral VIH-1 déplété de sa protéine Tat+15ng de la protéine Tat-VIH-1 recombinante et enfin 48h avec le surnageant viral VIH-1 déplété de sa protéine Tat+250ng de la protéine Tat-VIH-1 recombinante. Nous avons déterminé grâce à la technique de FISH en 3D, la microscopie confocale et l'analyse par le logiciel de mesure de distance, la distance intergénique entre *IGH* et *CMYC* des différentes conditions d'incubation des lymphocytes B. Toutes ces conditions sont comparées à un témoin négatif représenté par les lymphocytes B naïfs. Nous avons analysé un nombre variable de noyau: 273 LBN, 151 SV 48h, 194 SVTat$^-$ 48h, 175 SVTat$^-$ 48h+15ng et 91 SVTat$^-$ 48h+250ng.

Les résultats montrent bien une augmentation très significative (pval=1,22 10^{-22}) de l'ordre de 27,5% du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* 48h après incubation des lymphocytes B avec le surnageant viral VIH-1 par rapport au témoin négatif (4,7%). Après immunodéplétion de la protéine Tat, nous enregistrons une diminution du pourcentage de colocalisation *IGH-CMYC* de l'ordre de 15% en comparaison avec les lymphocytes B incubés avec le surnageant viral VIH-1 non déplété de Tat. En revanche, nous n'avons pas retrouvé la même valeur que celle du témoin négatif (15% au lieu de 4,7%). Nous avons donc réalisé deux immunodéplétions successives de Tat afin d'être assuré que le surnageant utilisé était totalement dépourvu de la protéine Tat et que la colocalisation *IGH-CMYC* observée après incubation avec le surnageant sans Tat n'était pas le fait unique de la protéine Tat. Enfin, en additionnant 15ng et 250ng de la protéine Tat recombinante dans le surnageant viral sans Tat, nous analysons une ré-

augmentation des valeurs de colocalisations *IGH-CMYC* de l'ordre de 32% et 30% (Figure 48).

En conclusion, la protéine Tat intervient dans la colocalisation des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B.

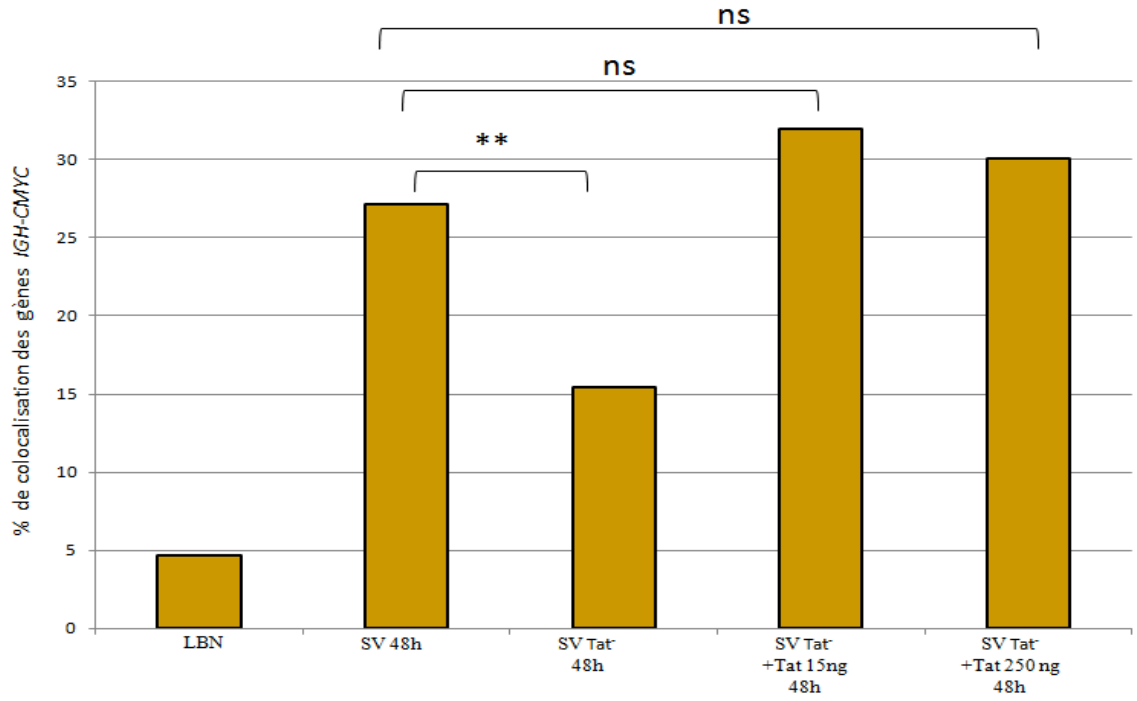


Figure 48. Pourcentage des signaux *IGH* et *CMYC* colocalisés.
Les signaux *IGH* et *CMYC* dont la distance qui les sépare est ≤ à 1µm sont considérés comme colocalisés. Le nombre de signaux colocalisé sa été comptabilisé dans des lymphocytes B naïfs (LBN) non infectés contrôle négatif, 48h après incubation avec le surnageant viral HIV-1 (SV 48h), 48h après incubation avec le surnageant viral HIV-1 déplété de Tat (SV tat$^-$48h), 48h après incubation avec le surnageant viral HIV-1 déplété de Tat auquel nous avons rajouté 15ng de Tat recombinant et 48h après incubation avec le surnageant viral HIV-1 déplété de Tat auquel nous avons rajouté 250ng de Tat recombinant. Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 LBN, 151 SV48h, 194 SVTat$^-$ 48h, 175 SVTat$^-$ 48h+15ng et 91 SVTat$^-$ 48h+250ng. *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$).

6.6. Quantification de la protéine Tat dans le surnageant viral VIH-1 par la technique de Dot Blot

Dans le but de se rapprocher des conditions physiologiques du surnageant viral VIH-1, nous avons voulu déterminer la concentration de celui-ci en protéine Tat. Pour cela nous avons eu recours à la technique de Dot blot suivant un protocole que nous rappelons

(matériels et méthodes). Nous avons déposé sur une membrane de nitrocellulose 10µl des différentes concentrations de la protéine Tat recombinante (10ng, 5ng, 3ng, 1,5ng, 0,5ng et 0,1ng) et, en regard de chaque concentration de Tat, nous avons déposé 10µl du surnageant viral (témoin négatif : H_2O). Nous avons incubé la membrane avec un anticorps primaire anti-Tat (1/1000). Une mesure de densité optique du film a été obtenue après révélation de la membrane, montre que les 10µl du surnageant viral correspondent à la concentration Tat de 0,5ng (Figure 49). Comme nous avons utilisé un volume de surnageant viral VIH-1 de 275µl/1ml de milieu/1million de cellules, nous en déduisons que nous avons utilisé dans nos conditions expérimentales une concentration de 15ng/ml de Tat.

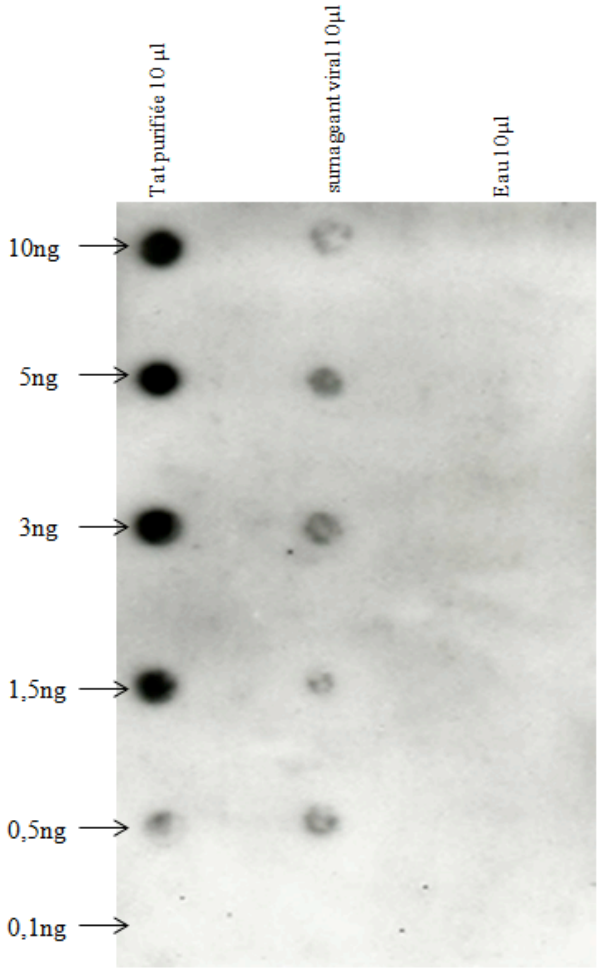


Figure 49. Quantification de la protéine Tat dans le surnageant viral VIH-1 par Dot Blot.

6.7. Le nombre de colocalisation *IGH-CMYC* dépend de la dose de Tat

De la même façon que précédemment, nous avons testé la dose de Tat quantifiée (15ng) dans le surnageant viral sur les lymphocytes B naïfs et donc sur la colocalisation *IGH-CMYC*. Pour cela nous avons incubé les lymphocytes B avec 15ng de la protéine Tat recombinante et analysé la colocalisation *IGH-CMYC*. Nous avons choisi d'analyser seulement les noyaux après 48h d'incubation en présence de Tat. 48 heures correspond au temps où l'on enregistre le plus de colocalisations *IGH-CMYC* avec le surnageant viral et les 250ng de Tat (Figure 45). Cette analyse a été réalisée sur 150 noyaux (Tat recombinant 15 ng) et 273 noyaux (lymphocytes B naïfs). Les résultats d'analyse des images de la microscopie confocale révèlent une augmentation de l'ordre de 16% du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* à 48h avec la dose 15ng de Tat contre 27% avec la dose 250ng de Tat à 48h. Les deux résultats obtenus ont été comparé par rapport à notre témoin négatif (LBN) (Figure 50).

Ce résultat montre que le pourcentage de colocalisations *IGH-CMYC* est effet « dose dépendante » de Tat.

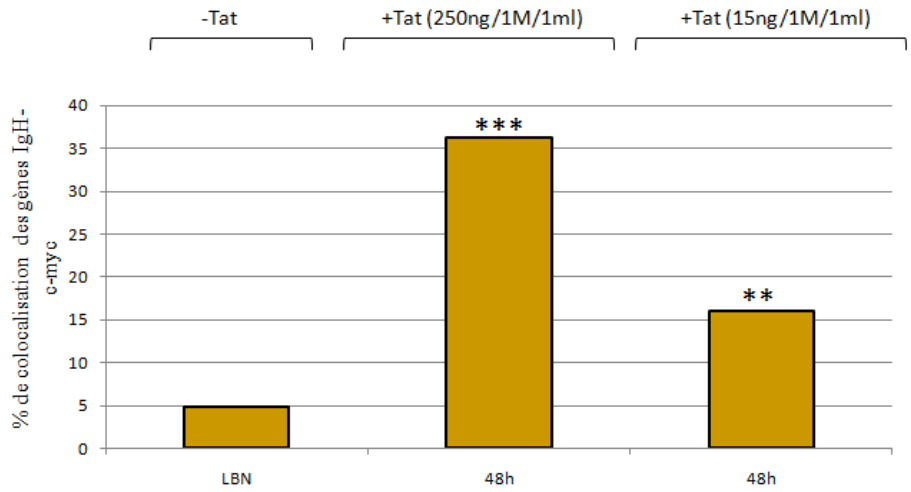


Figure 50. Pourcentage des signaux *IGH-CMYC* colocalisés.
Le nombre des signaux colocalisés a été comptabilisé dans les lymphocytes B naïfs (LBN) contrôle négatif, les lymphocytes B incubés 48h avec 250ng de Tat et les lymphocytes B incubés 48h avec 15ng de Tat. *** : $p<0,001$; ** : $0,001<p<0,01$;* : $0,01<p<0,5$; ns : non statistiquement significatif ($p>0,05$). Cette étude a été réalisée sur un nombre de noyaux de: 273 à 0h, 91 à 48h (250 ng) et 175 à 48h (15ng).

Maintenant qu'on a confirmé l'implication de la protéine Tat dans la colocalisation *IGH-CMYC*, nous nous sommes demandés avec quelles mécanismes la protéine Tat induit t'elle le réarrangement et le rapprochement des loci étudiés.

7. Etude des mécanismes impliqués dans la colocalisation des loci *IGH-CMYC*

7.1. La protéine Tat n'active pas les lymphocytes B

Un article de Lili Huang (Huang et *al*., 1997) démontrait une activation des lymphocytes B par Tat. Nous avons voulu confirmer ce résultat en étudiant l'effet de la protéine Tat sur l'activation des lymphocytes B naïfs pour savoir si l'effet de l'activation lymphocytaire par tat était responsable de cette délocalisation.

Nous avons donc utilisé les marqueurs d'activation membranaire des lymphocytes B (CD23, CD69 et CD80) ainsi que le marqueur de tous les lymphocytes B (CD19). Les résultats de cytométrie en flux révèlent que la protéine Tat seule est incapable d'activer les lymphocytes B (Figure 51). L'activation n'est pas le mécanisme responsable des effets observés par Tat.

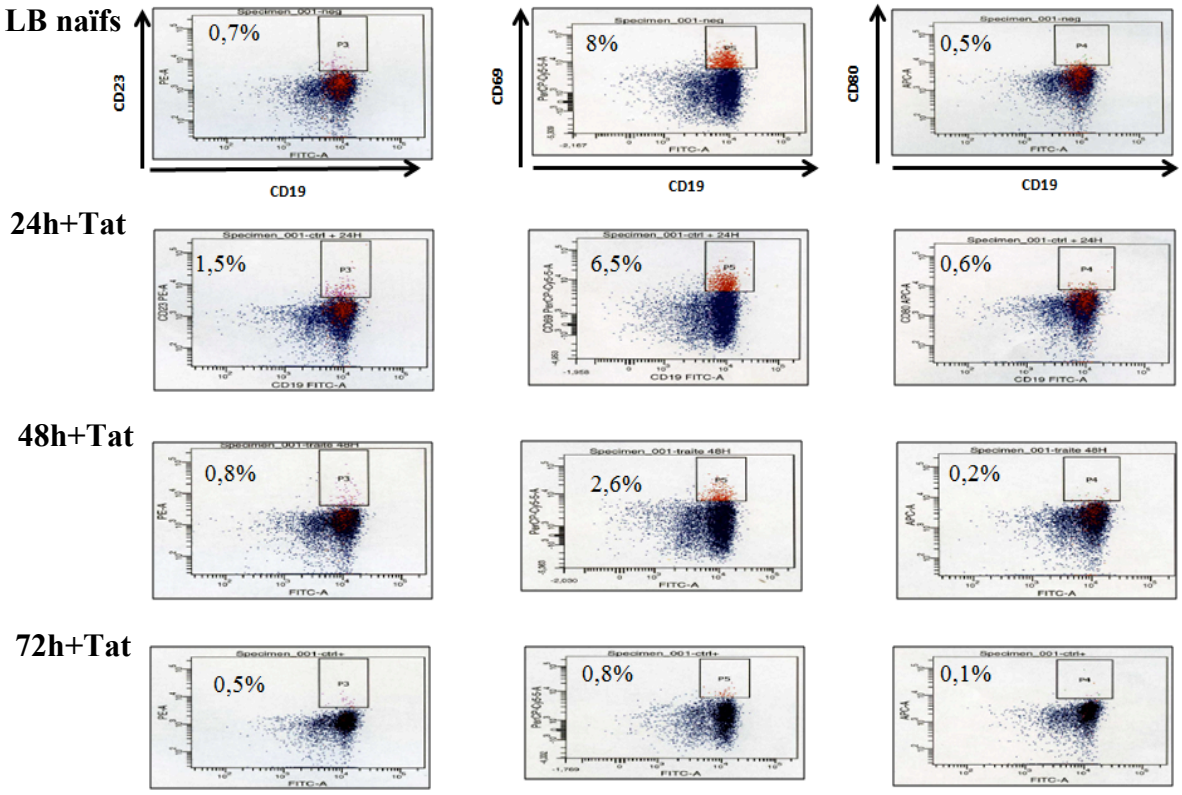


Figure 51. Analyse de l'expression des marqueurs membranaire CD19, CD23, CD69 et CD80 par cytométrie en flux des lymphocytes B durant une cinétique d'incubation des lymphocytes B naïfs avec la protéine Tat recombinante (24h, 48h et 72h).

7.2. La protéine Tat recombinante induit la surexpression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B

Des travaux ont montré que la protéine Tat induit non seulement la transactivation de l'expression des gènes viraux mais aussi des gènes cellulaires y compris le géne *CMYC* (Marban et *al*., 2011).

Nous avons ensuite évalué l'expression du gène *CMYC* par qPCR au cours de la cinétique d'incubation des lymphocytes B par Tat afin de déterminer l'effet de la protéine sur l'expression de ce gène.

Les résultats montrent un doublement du niveau de l'expression de *CMYC* à 48h (pval= 0,0023) en comparaison avec notre contrôle (Figure 52). L'augmentation de l'expression du gène *CMYC* après incubation des lymphocytes B par Tat peut être due à des facteurs autres que l'activation.

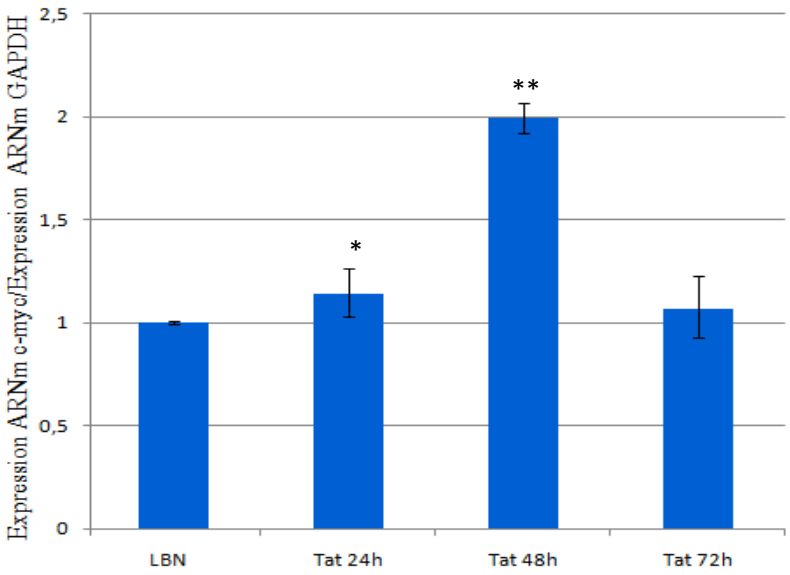


Figure 52. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de *CMYC* en fonction de l'expression de *GAPDH* dans les lymphocytes B naïfs et dans les lymphocytes B incubés avec la protéine recombinante Tat (24h, 48h et 72h).

7.3. La protéine Tat-C22 mutante n'induit pas la surexpression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B

Comme Tat mutée n'induit pas la relocalisation de *CMYC* et d'*IGH*, nous nous sommes intéressés à l'effet de la protéine Tat mutée sur l'expression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B. Pour cela nous avons procédé de la même manière que précédemment pour la protéine Tat recombinante. Par qPCR, nous avons étudié l'expression du gène *CMYC* avant et après incubation des lymphocytes B par la Tat-C22.

Les résultats montrent une expression de *CMYC* plus au moins stable durant toute la cinétique d'incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat mutée (Figure 53). Ainsi, la Tat mutante, contrairement à la Tat recombinante, est incapable d'induire efficacement la colocalisation de *IGH* et *CMYC* et la surexpression du gène *CMYC*.

La fonction de transactivation virale et cellulaire semble être impliquée dans les modifications observées après incubation des lymphocytes B avec Tat.

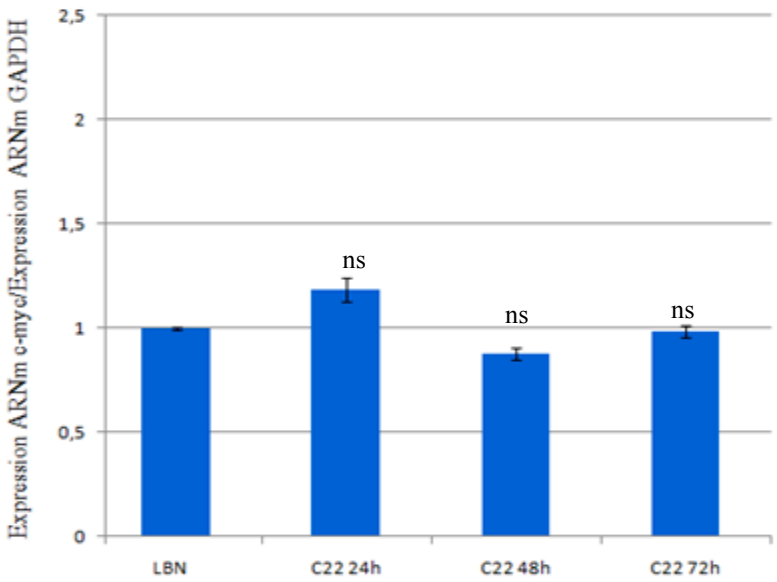


Figure 53. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de *CMYC* en fonction de *GAPDH* dans les lymphocytes B naïfs et dans les lymphocytes B incubés avec la protéine Tat mutante en C22 (24h, 48h et 72h).

7.4. La superposition des loci *IGH* et *CMYC* colocalisés avec la machinerie transcriptionnelle dans les lymphocytes B traités avec Tat

Des études ont montré que l'activation des cellules B de souris, induit l'augmentation de la colocalisation *IGH* et *CMYC*. Par ailleurs, le locus *IGH* et locus *CMYC* colocalisent aussi souvent avec les usines de transcription partagées (sites de transcription active ARN polymérase II) (Osborne et *al*., 2007). Cette corrélation suggère que la proximité physique de ces deux gènes avec les usines de transcription conduit à la grande fréquence des translocations chromosomiques. De plus il a été montré que les gènes les plus exprimés sont localisés au centre du noyau à proximité de la machinerie transcriptionnelle, contrairement aux gènes localisés à la périphérie du noyau qui sont moins exprimés (Kosak et *al*., 2002).

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'analyse des colocolisations des loci *IGH, CMYC* et l'ARN polymérase II dans les noyaux incubés avec la protéine Tat. Nous avons fixé les cellules B incubées avec la protéine recombinante Tat, puis hybridé celles-ci avec les deux sondes *IGH* et *CMYC* et enfin réalisé un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre l'ARN polymérase II (Active Motif RNA pol II CTP phospho). L'analyse des images obtenues, sans analyse statistique sous-jacente, révèle que, sur 45 noyaux avec colocalisation *IGH-CMYC*, 30 noyaux colocalisent aussi avec l'ARN polymérase II (Figure 54).

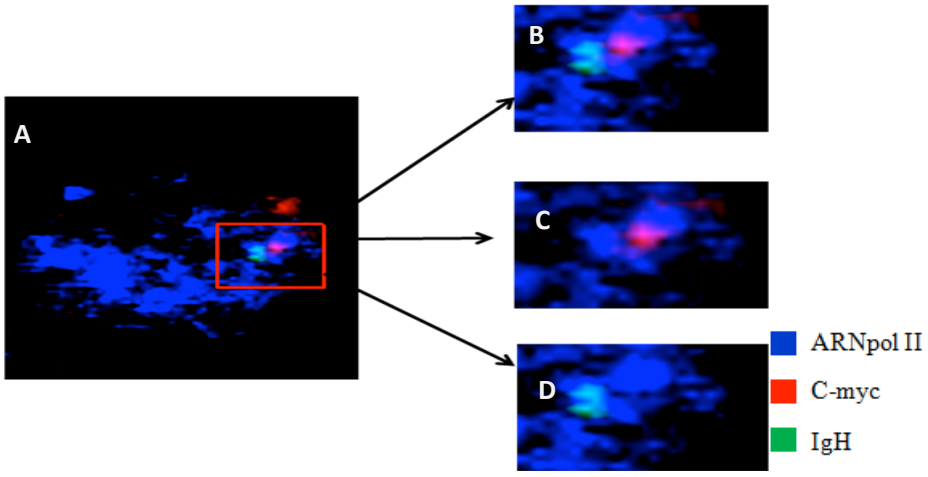


Figure 54. La forme active de l'ARN polymérase II est présente où les gènes *IGH* et *CMYC* colocalisent. Immuno-FISH d'un lymphocyte B incubé avec la protéine Tat recombinante **(A)** Section médiane du noyau **(B)** Agrandissement de la même section médiane, permettant une meilleure visualisation de la proximité entre ces éléments : ARN polymérase II (bleu), *CMYC* (rouge) et *IGH* (vert) **(C)** Agrandissement du locus *CMYC* **(D)** Agrandissement du locus *IGH*.

7.5. La protéine Tat modifie la structure de la chromatine dans les noyaux des lymphocytes B

Des travaux ont montré que la protéine Tat peut affecter le remodelage de la chromatine (Verdone et *al*., 2005) induisant une modification de l'organisation nucléaire avec le risque d'une augmentation de survenue de remaniements de structures chromosomiques (translocation,..). Ce remodelage fait intervenir une machinerie cellulaire spécialisée comportant des enzymes capables de modifier les histones par acétylation, phosphorylation ou méthylation, rompant ainsi les liaisons ADN-histones et permettant la translocation des nucléosomes (Berger, 2002).

En se basant sur ces données, nous avons analysé les variations de la structure de la chromatine provoquée par la protéine Tat dans les noyaux des lymphocytes B. Pour cela, nous avons étudié par la technique d'immunofluorescence l'acétylation et la méthylation des histones H3K9 dans les noyaux des lymphocytes B incubés 48h avec la protéine Tat en utilisant comme contrôle les lymphocytes B naïfs non traités avec la protéine Tat. Nous avons alors fixé et marqué les cellules B incubées/ou non avec la protéine Tat avec deux anticorps dirigés contre les histones activées (H3K9 acétylée) et non activées (H3K9 triméthylée).

Les résultats de la microscopie révèlent un changement de la distribution des histones H3K9 acétylées et des histones H3K9 triméthylées au niveau des noyaux traités par Tat en comparaison de notre témoin négatif comme nous pouvons le voir sur la figure ci-dessous (Figure 55). En effet, nous avons observé une décondensation des histones H3K9 triméthylée après traitement avec la protéine Tat. Nous avons également observé une condensation des histones H3K9 acétylée après traitement avec notre protéine par rapport au témoin négatif. Cette modification de l'organisation de la chromatine peut expliquer les effets observés avec la délocalisation de *CMYC* vers *IGH*.

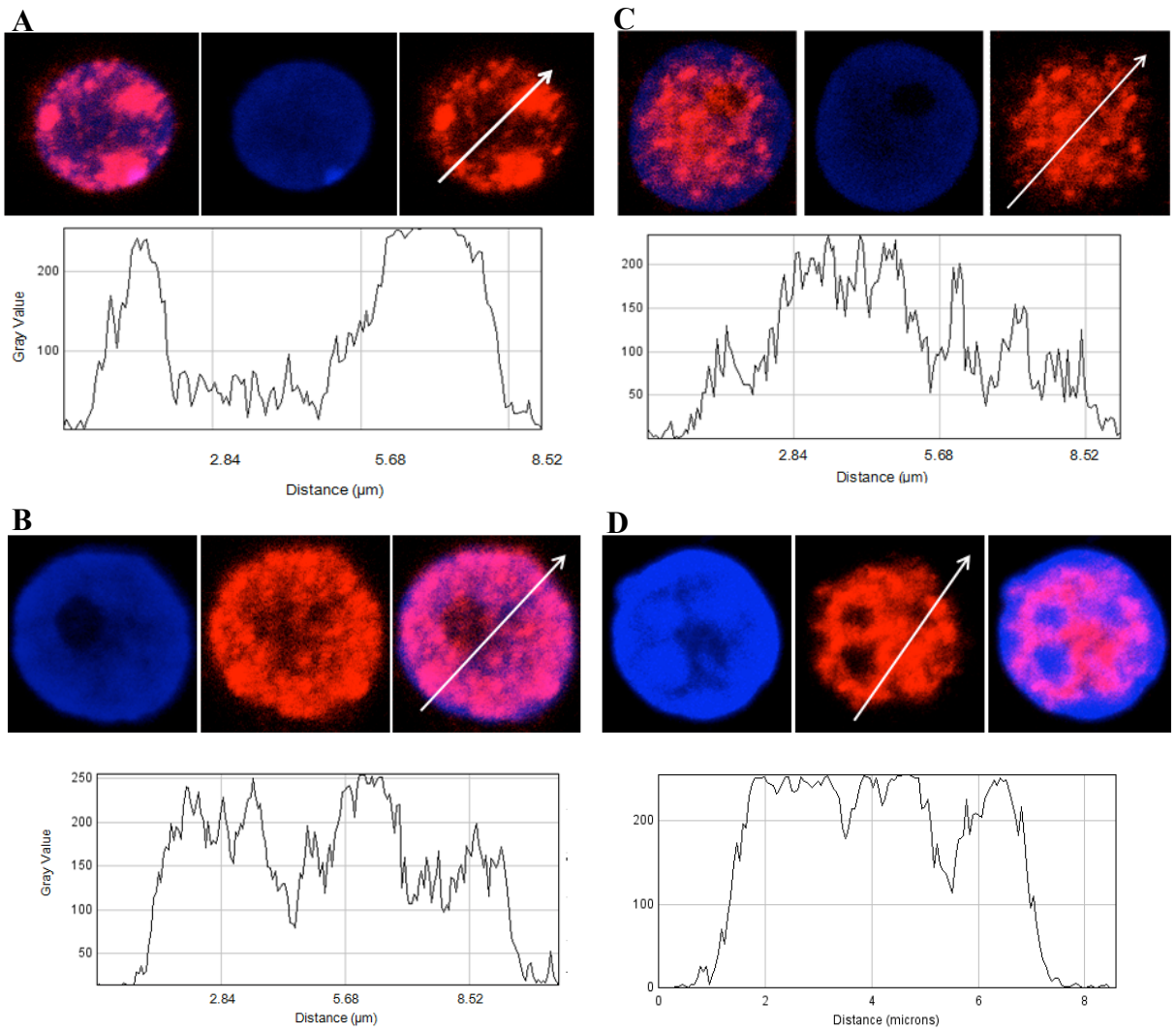


Figure 55. Analyse de la structure de la chromatine avant et après incubation des lymphocytes B naïfs avec la protéine Tat recombinante. Le noyau est marqué à l'aide du To-PRO3 visible en bleu **(A)** H3K9 triméthylées chez le contrôle négatif non traité avec la protéine Tat. **(B)** H3K9 triméthylées dans les lymphocytes B traités avec la protéine Tat. **(C)** histones acétylées chez le contrôle négatif non traité avec la protéine Tat. **(D)** H3K9 acétylées dans les lymphocytes B traités avec la protéine Tat.

Afin de savoir si cette perturbation de la distribution de la chromatine est impliquée dans le réarrangement et la dérégulation de l'expression du gène *CMYC,* nous avons étudié ce mécanisme de plus prés et ceci en analysant les résultats de CHIP on chip des histones H3K9 acétylées et H3K9 triméthylées des lymphocytes B traités et non traités avec Tat sur l'organisation de la chromatine à l'échelle génomique.

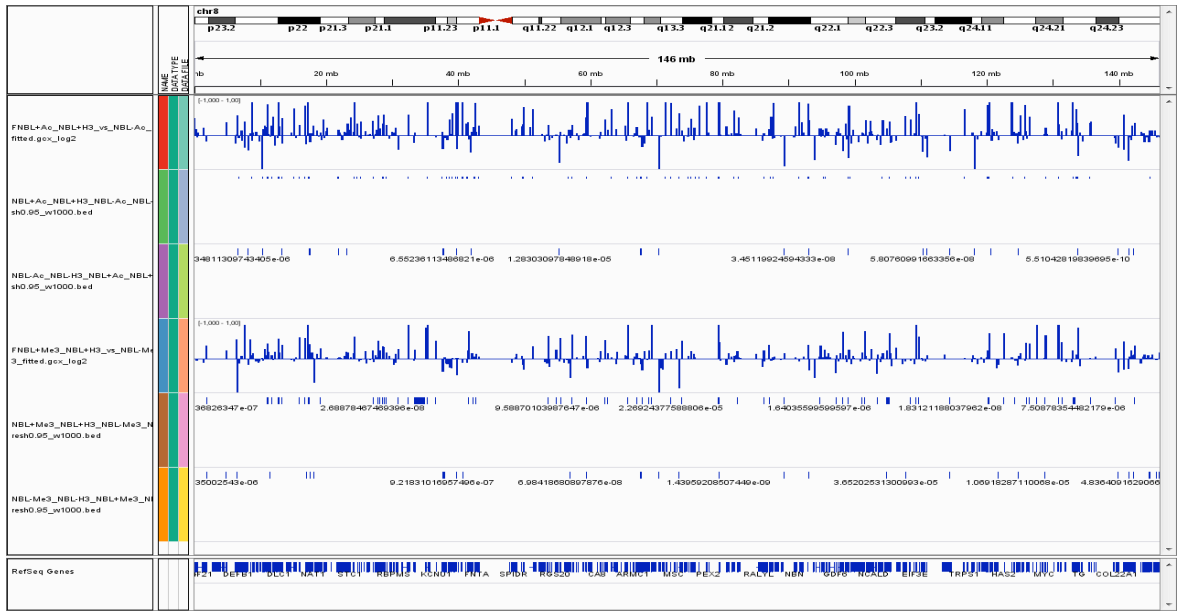
Nous avons observé une augmentation du niveau de l'acétylation et triméthylation des histones à l'échelle génomique et aussi au niveau du chromosome 8. En revanche, nous

n'avons observé aucune modification dans la région 8q24 (la région qui comporte le locus *CMYC*) (Figure 56).

Nous avons pu conclure que la protéine Tat induit la modulation de la chromatine mais elle n'a aucun effet sur l'organisation du locus *CMYC*.

A

Chromosome8



B Région 8q24

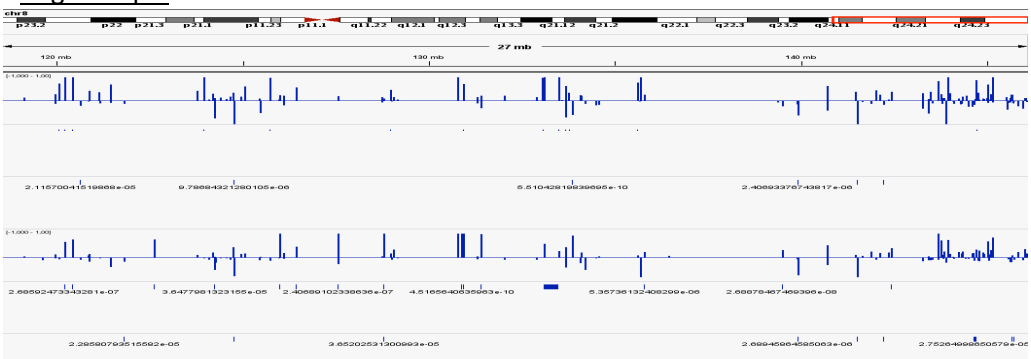


Figure 56. Résultats de ChIP-on-chip du chromosome 8 dans les lymphocytes B. (A) Lignes 1-3: pics du niveau de l'acétylation H3K9Ac; lignes 4-6: pics du niveau de triméthylation H3K9Me3. Lignes 1 et 4: niveau de H3K9 modifié dans les lymphocytes B traitées par Tat par rapport au témoin non-traité. Lignes 2 et 5: les régions avec une augmentation significative du niveau de l'acétylation ou de la triméthylation après traitement avec Tat; lignes 3 et 6: les régions avec une diminution significative du niveau de l'acétylation ou de la triméthylation après traitement avec Tat. **(B)** Le niveau d'acétylation et triméthylation dans la région 8q24 codante pour le gène *CMYC*.

CONCLUSION

Conclusion

Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rôle des virus EBV et VIH-1 dans la réorganisation des gènes *CMYC* et *IGH* impliqués dans le BL. En effet, la translocation de l'oncogène CMYC du côté du locus *IGH* est responsable de 80% des cas du BL. Il est souvent difficile de comprendre les mécanismes menant à l'apparition des translocations. Nous savons déjà que les translocations dans le locus *IGH* peuvent se former au cours du processus de maturation des lymphocytes B (hypermutation somatique), nous savons aussi que la proximité entre les deux loci augmente la probabilité de leurs translocations (Nikiforova et *al*., 2000). La proximité prolongée d'autres gènes avec le gène *IGH* dans le noyau des lymphocytes B facilite l'apparition d'une translocation au cours de la maturation physiologique des cellules B et peut augmenter les taux des cellules cancéreuses.

Nous avons pu montrer que les loci *IGH* et *CMYC* sont localisés différemment dans les noyaux des lymphocytes B naïfs humains. En effet, le locus *IGH* est localisé préférentiellement à proximité du centre du noyau, en revanche, le locus *CMYC* est plutôt proche de la périphérie nucléaire. Les mêmes résultats ont déjà été obtenus chez la souris (Osborne et *al*., 2007). Il faut noter que ces deux loci (*IGH* et *CMYC*) sont portés par deux chromosomes différents et distants chez l'homme ainsi que chez la souris. Les deux gènes *IGH* et *CMYC* sont distants dans la plupart des noyaux des lymphocytes B naïfs (95-97%), ce qui rend leur recombinaison par le mécanisme NHEJ peu probable.

Il a été montré chez la souris que l'activation des lymphocytes B induit l'augmentation de la colocalisation des loci Igh et cMyc ainsi que la surexpression du gène cMyc (Osborne et *al*., 2007). Pour les lymphocytes B humains, nous avons montré qu'il existe plusieurs facteurs qui interviennent dans l'augmentation des taux de colocalisation des gènes *IGH* et *CMYC* (distance entre les gènes dans le noyau est ≤ à 1 micron) dans les lymphocytes B.

Nous avons tout d'abord montré que l'activation par le cocktail (anti-CD40, anti-IgM et IL4), induit une colocalisation précoce et non durable des deux gènes *IGH* et *CMYC*. En effet, nous avons observé une augmentation très significative des colocalisations des loci *IGH-CMYC* seulement à 24h.

Au cours de l'activation des lymphocytes B, le locus *IGH* codant pour la chaîne lourde constitue une zone critique pour les processus d'excision, suivis de remodelage de l'ADN,

durant le mécanisme SHM, ce qui va créer une forte instabilité, favorisant donc l'échange du matériel génétique avec d'autres chromosomes situés à proximité (Marculescu et *al*., 2006).

Nous avons montré que l'infection par EBV et l'incubation avec le VIH-1 peuvent induire une augmentation tardive et durable des colocalisations des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B.

Il faut noter aussi que la cinétique de rapprochement des gènes *IGH-CMYC* après infection avec l'EBV ou incubation avec le VIH-1 était différente par rapport à l'activation induite par les cytokines et les anticorps. L'effet observé par l'EBV et le VIH-1 était plus durable qu'après l'activation avec le cocktail. Nous pouvons conclure que la probabilité des translocations induites par les virus EBV et VIH-1 est supérieure à celle induite par l'activation des lymphocytes. Dans ce cas, la proximité prolongée des loci *IGH-CMYC* viro-induite peut favoriser leurs translocations et le déclenchement d'un BL.

Nous avons démontré une augmentation de l'expression du gène *CMYC* à 72h après infection des lymphocytes B par EBV, ceci peut être dû soit à l'activation suite à l'infection par EBV soit à la relocalisation du gène *CMYC* vers un compartiment transcriptionnel actif. L'arrangement tridimensionnel du génome joue vraisemblablement un rôle dans l'expression des gènes, et semble tout au moins participé à sa régulation. La dérégulation du gène *CMYC* est donc certainement liée à la délocalisation observée après infection par EBV et l'incubation avec VIH-1. Pour le VIH-1, nous avons décidé de révéler les facteurs responsables aux effets observées.

Nous avons montré grâce à la délétion du récepteur gp120 du VIH-1 que l'interaction gp120 et CD21 n'est pas le facteur responsable de la délocalisation des loci *IGH* et *CMYC* analysés dans les lymphocytes B incubés avec le surnageant VIH-1. Ce résultat confirme l'effet minoritaire de l'activation des lymphocytes B sur la colocalisation *IGH-CMYC*.

Nous avons testé un composant du surnageant viral VIH-1: la Tat-VIH-1 (un transactivateur de la transcription viral). Cette protéine peut intervenir dans plusieurs processus cellulaires et viraux (cette partie sera plus détaillée dans la discussion). Comme elle peut intervenir dans le déclenchement des lymphomes de type B (Kundu et *al*., 1999).

Nous avons observé une augmentation de la colocalisation entre *IGH* et *CMYC* suite à l'incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat recombinante. Les résultats ont été

confirmés en testant la spécificité de cette réorganisation génique induite par Tat, et ceci en utilisant un gène contrôle (Beta-Globine) à la place du gène *CMYC* et en utilisant un mutant de Tat (Tat-C22) à la place de la Tat recombinante.

Nous avons montré que l'abolition de la fonction transactivatrice de Tat en utilisant un Tat mutant inhibe la colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B. Ce résultat montre bien l'importance du ce mécanisme dans la réorganisation nucléaire des loci étudiés.

Nous avons encore confirmé l'implication de la protéine Tat dans la délocalisation des gènes *IGH* et *CMYC*. En effet, nous avons déterminé une diminution du nombre de colocalisation *IGH-CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B incubés avec le surnageant VIH-1 déplété de sa protéine Tat. Cette diminution est rapidement rétablie après addition de la protéine Tat recombinante.

Nous avons aussi montré que Tat n'est pas le seul composant du surnageant viral VIH-1 qui est impliquée dans la réorganisation des gènes *IGH* et *CMYC*. En effet, la déplétion de la protéine Tat ne nous permet pas de retrouver la valeur initiale de la colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B naïfs.

Nous avons déterminé par la méthode de Dot blot, la concentration de la protéine Tat dans le surnageant viral VIH-1. Nous avons déterminé une concentration similaire à celle retrouvé *in vivo* (Westendorp et *al*., 1995). Ensuite, nous avons testé la concentration déterminée de Tat-VIH-1 sur l'organisation génique dans les noyaux des lymphocytes B. Nous avons observé un effet dose dépendant de Tat par rapport à la colocalisation des gènes *IGH-CMYC*.

Nous avons essayé de trouver le mécanisme responsable impliqué dans la réorganisation nucléaire et la colocalisation *IGH-CMYC* induite par Tat.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de Tat sur l'activation des lymphocytes B naïfs, nous avons montré que la protéine Tat seule est incapable d'activer les lymphocytes B. Ceci confirme que les effets observés n'ont aucun rapport avec l'activation.

Dans un second temps, nous avons analysé par qPCR l'expression du gène *CMYC*. En effet, Tat peut modifier en plus de l'expression des gènes viraux les gènes cellulaires (Sharma et *al*., 1995). Nous avons enregistré une augmentation de l'expression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B incubés avec la protéine Tat recombinante. La surexpression de *CMYC* induite

par la protéine Tat peut être due soit à l'action transactivatrice de la protéine Tat soit à la délocalisation du locus *CMYC* vers un compartiment de transcription actif. Les résultats obtenus indiquent un lien entre la dérégulation de l'organisation spatiale du gène *CMYC* et son expression.

Des expériences d'immunofluorescence couplées au FISH en 3D sur des lymphocytes B incubés avec Tat, nous permettent d'observer une délocalisation du locus *CMYC* vers le centre du noyau du côté d'*IGH* et leurs superpositions avec la forme active de l'ARN polymérase II. Cette observation est conforme avec les résultats de Fraser sur la souris (Osborne et *al*., 2007). La surexpression du gène *CMYC* peut être la conséquence de sa délocalisation du côtés des usines de transcription.

La réorganisation spatiale des gènes d'intérêts suite à la délocalisation du locus *CMYC* à proximité du locus *IGH* dans les noyaux des lymphocytes B incubés avec la protéine Tat peut être due aussi à la modulation de la structure de la chromatine provoquée par la protéine Tat (Verdone et *al*., 2005) (cette partie sera plus détaillée dans la discussion). En effet, nous avons observé par immunofluorescence une différence de l'organisation des histones H3K9 acétylées (chromatine active) et méthylées (chromatine non active) dans les lymphocytes B incubés avec la protéine Tat par rapport aux lymphocytes B naïfs (non traités). Cette réorganisation de la chromatine peut être responsable de la délocalisation de l'oncogène *CMYC* et sa surexpression.

Enfin pour confirmer cette dernière hypothèse, nous avons analysé le niveau d'acétylation et triméthylation des histones dans les lymphocytes B traités par Tat et les lymphocytes B contrôle (non traités) à l'échelle génomique. Nous avons constaté une éventuelle modification de l'organisation de la chromatine. En revanche nous n'avons observé aucune modification ni au niveau de l'acétylation et ni au niveau de la triméthylation dans la région 8q24.

Nos résultats montrent que le remodelage de chromatine induit par Tat n'est pas responsable des effets observés sur le gène *CMYC*.

DISCUSSION

Discussion

1. Position nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs

Plusieurs études ont montré que la localisation des gènes et chromosomes dans de nombreux types cellulaires est spécifique et bien déterminée. Il a été postulé que l'organisation spatiale non aléatoire du génome dans le noyau de la cellule contribue à la survenue de la translocation chromosomique. En effet, on n'observe pas n'importe quelle translocation entre n'importe quels partenaires, ces remaniements ne sont pas aléatoires et des associations entre certains chromosomes semblent privilégiées (Branco and Pombo, 2006). Il a été suggéré que les translocations se produisent de préférence entre les régions localisées à proximité au niveau du génome. Les cassures double brin ne sont pas mobiles et il est donc nécessaire que les deux partenaires du réarrangement soient en contact ou proches lors de la (ou des) cassure(s) (Branco and Pombo, 2006).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux positionnements des régions génomiques et à la distance qui les sépare. Le lymphome de Burkitt (BL) est caractérisé dans 80% des cas par la translocation t(8;14) délocalisant l'oncogène *CMYC* porté par la région 8q24 à proximité du locus codant pour la chaine lourde d'immunoglobuline *IGH* localisé sur la région 14q32. En effet, cette translocation sous-entend nécessairement qu'il existe un contact entre le chromosome 8 et le chromosome 14 et donc une proximité physique entre les régions 8q24 et 14q32. La question qui se posait alors était de savoir ce qu'il en était de la position de ces deux régions au sein du noyau dans les lymphocytes B naïfs.

Dans les lymphocytes B naïfs, la région 14q32 du locus *IGH* est localisée au centre du noyau, à l'inverse de la région 8q24 du locus *CMYC* qui est retrouvée plus au moins proche de la périphérie nucléaire. La colocalisation de ces deux loci dans les lymphocytes B naïfs est très faible (4,7%).

Une étude similaire a été réalisée par l'équipe de Fraser chez la souris, l'analyse de la localisation spatiale des loci IgH et cMyc dans les lymphocytes B naïfs montrent une répartition différente au sein du noyau. En effet, IgH est complètement central alors que cMyc est plutôt périphérique avec, seulement, 6,5% de colocalisation (Osborne et *al*., 2007). Malgré la spécificité de l'organisation nucléaire chez les différentes espèces, nous constatons que la

localisation des gènes *IGH* et *CMYC* sont similaires aussi bien chez la souris que chez l'homme.

Pour le gène *IGH*, la mutation des locus des immunoglobulines codant pour les chaînes lourdes dans les centres germinatifs est un évènement physiologique indispensable pour créer les anticorps spécifiques contre un pathogène. Dans les conditions physiologiques, la SHM provoquent des cassures double brin au niveau du locus *IGH*. Ces cassures sont réparées par des mécanismes spécifiques et bien adaptés. Dans le cas de la réparation par NHEJ, ce dernier permet de joindre des régions de l'ADN qui sont à proximité. Cela signifie que la SHM peut induire des translocations chromosomiques si d'autres gènes sont localisés près du site de la réparation. La proximité entre deux régions du génome semble donc importante pour la survenue d'une translocation.

D'après nos résultats la probabilité de la translocation des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B naïfs est peu probable car les gènes *IGH* et *CMYC* sont situés dans deux régions différentes du noyau: ils ne peuvent donc pas se « joindre » pendant le processus de la réparation des cassures double brin par NHEJ durant la SHM. On ne connaît actuellement aucune «force» qui organise des chromosomes dans le noyau.

Les virus EBV et VIH-1 sont-ils impliqués dans la réorganisation nucléaire et la tumorigenèse du BL ?

2. L'activation des lymphocytes B par le cocktail des cytokines et anticorps induit la réorganisation spatiale des loci *IGH* et *CMYC*

Nos résultats confirment que l'activation des lymphocytes B naïfs humains dans des conditions proches de l'activation physiologique (par un cocktail contenant anti-CD40, anti-IgM et IL4) induit le rapprochement des loci *IGH* et *CMYC*, comme observé par Fraser et ces collaborateurs sur les lymphocyte B de souris. Le nombre maximum de cellules avec colocalisations *IGH*/*CMYC* a été observé après 24h d'activation (34,22%), ce qui est conforme aussi avec les résultats de l'équipe de Fraser ayant observé une délocalisation rapide du gène cMyc à proximité du locus du gène IgH dans les lymphocytes B de souris (16 et 18% de cellules avec colocalisations, 5-15 minutes après activation). Il faut noter qu'Osborne et *al* n'ont pas fait une cinétique large d'activation. Nous pouvons conclure que, dans les lymphocytes B humains, la délocalisation du *CMYC* est un événement assez précoce et peu

durable. Au bout de 48h d'activation, nous observons déjà une baisse significative de nombre de cellules avec *IGH*/*CMYC* colocalisés (12,14% à 48h par rapport à 34,22% à 24h).

Nous avons testé plusieurs cocktails d'activation des lymphocytes B en utilisant des cytokines connues pour activer les lymphocytes B humains (l'article de Lefevre et ces collaborateurs nous a aidés dans notre choix) (Lefevre et *al*., 1999). Nous n'avons pas détaillé dans le chapitre « résultats » ces tests avec les différents cocktails car nous n'avons pas obtenu d'activation maximale des lymphocytes B. Seul le cocktail utilisé par Osborne et ces collaborateurs (anti-CD40, anti-IgM et IL4) (Osborne et *al*., 2007) a permis une activation maximale des lymphocytes B avec une mortalité cellulaire faible. Ainsi, nous avons pu comparer les résultats de notre travail avec ceux de cette équipe.

Nous avons montré que l'augmentation de l'expression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B activés coïncidait avec le temps où le maximum de colocalisations *IGH-CMYC* était observé. Cette augmentation peut être due à la délocalisation du gène *CMYC* d'un compartiment silencieux ou inactif vers un compartiment proche des usines de transcription. Ces résultats sont similaires à ceux de l'équipe de Fraser qui ont eux aussi montré une augmentation du gène cMyc suite à l'activation des lymphocytes B de souris : ceci a été expliqué par la délocalisation de ce gène du côté l'ARN polymérase II (Figure 57).

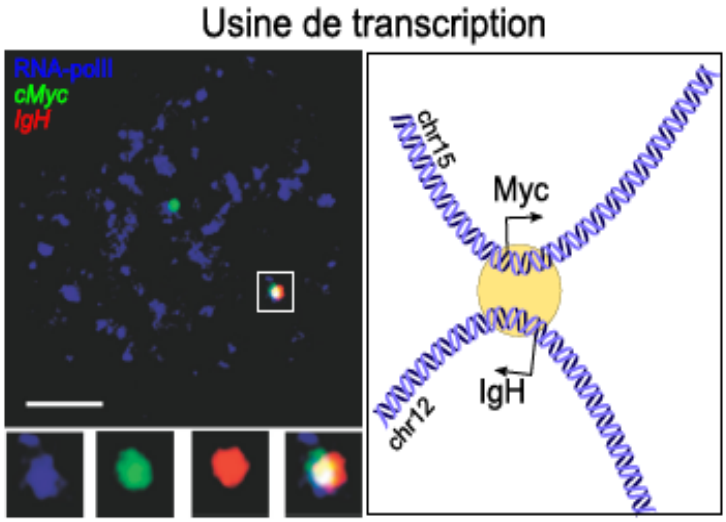


Figure 57. cMyc et IgH peuvent être localisés dans la même unité de transcription lorsqu'ils sont exprimés. L'image d'immuno-FISH montre en bleu l'ARN-pol II phosphorylée, en rouge IgH et en vert cMyc dans des lymphocytes B stimulés murins. Barre = 2µm (Osborne et *al*., 2007).

3. EBV induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs

La découverte de l'EBV est intimement liée au BL car une lignée Burkitt a permis que le virus soit isolé. L'EBV est associé dans 98% des cas au BL endémique (en Afrique équatoriale) et 30% des cas au BL sporadique. Les cellules B humaines au repos sont facilement transformées par EBV en une lignée lymphoblastoïde (Kieff et *al*., 1990).

Une équipe a analysé le réarrangement des chromosomes 17 et 18 (de même taille mais de densité en gènes différente) pendant le processus de l'infection des lymphocytes B par EBV. Ils ont observé une relocalisation des chromosomes au cours de la cinétique d'infection (Li et *al*., 2010) confirmée par analyse statistique. D'après nos résultats ainsi que celles de l'équipe de Li, nous pouvons conclure que l'infection par EBV peut avoir un impact général sur la stabilité génomique et donc sur la délocalisation de certains chromosomes au cours de l'infection.

En effet, plusieurs études décrivent un haut degré de stabilité de la disposition du génome à grande échelle dans les noyaux cellulaires (Lucas and Cervantes, 2002; Zink and Cremer, 1998). Cependant, les mouvements considérables des chromosomes ou des sous-régions chromosomiques ont été observés pendant le cycle cellulaire (Martou and De Boni, 2000; Solovei et *al*., 2004). Une modification des régions géniques ont aussi été trouvées pendant le stade granulocyte et la différenciation de cellule souche embryonnaire (Bartova et *al*., 2008; Bartova et *al*., 2001).

La première partie de notre travail nous a fait émettre l'hypothèse que la stimulation des lymphocytes B par EBV est le facteur responsable d'une telle réorganisation spatiale.

Nous avons observé une augmentation du nombre de cellules avec une colocalisation des gènes *IGH/CMYC* dans les lymphocytes B durant la cinétique d'infection par EBV et une délocalisation du locus *CMYC* à proximité du locus *IGH* vers le centre de noyau. Il faut noter, que la cinétique de colocalisation des lymphocytes B en présence d'EBV est différente de celle observée après activation par les cytokines. Le nombre de cellules avec des colocalisations augmente au cours du temps : 10,24% à 24h, 32,11% à 48h et 34,48% à 72h comparé à 4,7% de cellules avec colocalisations *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B naïfs sans stimulation. L'activation des cellules B induite par EBV peut intervenir dans la

colocalisation *IGH-CMYC*, mais l'effet de l'infection par le virus est beaucoup plus important. Cette observation est « similaire » à celle de l'équipe de Li.

Les cellules infectées chroniquement avec EBV (LCLs) présentent un pourcentage de colocalisations plus élevé que les lymphocytes B naïfs, mais non aussi élevé qu'après 48h et 72h d'infection des lymphocytes B naïfs par EBV (environ 10% pour les LCLs comparées à 32,11-34,48% pour 48 ou 72 h après l'infection des cellules naïfs par EBV). Cette observation pourrait nous conduire à supposer que les événements qui peuvent augmenter le nombre de translocations *CMYC*/*IGH* sont assez précoces au cours de l'infection virale par EBV. Cette étude cinétique n'a pas été réalisée par d'autres équipes sur les LB et sur *CMYC* et *IGH*. A notre connaissance, il n'existe aucun article qui montre les mêmes effets observé que nous.

Nous avons montré aussi que la proximité des loci *IGH-CMYC* induite par le virus est plus durable dans le temps que la proximité physiologique induite par l'activation des lymphocytes B. Dans ce cas, la proximité prolongée des loci *IGH-CMYC* viro-induite pourrait favoriser leurs translocations et le déclenchement d'un BL. L'EBV peut amener à une augmentation plus importante de la probabilité des translocations entre ces deux loci.

Nous avons déterminé une augmentation précoce (24h) de l'expression de *CMYC* dans les lymphocytes B activés et une surexpression tardive (72h) dans les lymphocytes B infectés par EBV. Cette variation de la surexpression du gène *CMYC* peut être due à sa délocalisation d'un compartiment nucléaire répressif à un compartiment nucléaire actif. Il a été aussi démontré que le proto-oncogène *CMYC* peut être activé par le transactivateur EBNA2 (protéine nucléaire de l'EBV) (Kaiser et *al*., 1999).

Dans l'intérêt de montrer si ces résultats sont spécifiques à une infection par EBV, nous avons voulu testé un autre virus qui est aussi associé au BL.

4. Le VIH-1 induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs

Le VIH-1 constitue un autre facteur de risque puisqu'il est aussi associé au BL. Il a été montré que ce virus est capable de stimuler les lymphocytes B naïfs via l'interaction gp120 (récepteurs du VIH-1) et CD21 (ou CR2 des lymphocytes B naïfs) (Malaspina et *al*., 2002).

L'infection par le VIH-1 entraine, dès ses phases initiales, des modifications du compartiment lymphocytaire B tant au plan de l'activation et de l'ontogénie, qu'au plan fonctionnel (DMilito, 2004).

Nous avons observé un effet similaire sur le rapprochement des deux loci *IGH* et *CMYC* des cellules B incubéess avec le VIH-1 avec celui des cellules B infectées par l'EBV. En effet, le VIH-1 induit lui aussi la colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B en délocalisant *CMYC* vers le centre du noyau à proximité d'*IGH*.

Nous avons montré que le VIH-1 (souche NL4.3) est capable d'activer les lymphocytes B. Il faut noter que l'activation, , faible, n'est pas durable par rapport à l'activation induite par des cytokines et les anticorps (62,7 et 13,7% des cellules CD23+ 24h après activation par anti-CD40/anti-IgM/IL4 ou le VIH-1, respectivement, comparé à 2,5% des cellules CD23+ pour les lymphocytes B naïfs ; des quantités comparables des cellules CD69+ et CD80+ (environ 53 et 57% pour le CD69+ comparé à 9% pour les cellules non-traitées, environ 20 et 26% pour le CD80+ comparé à 4% pour les cellules non-traitées). Nous n'avons observé aucune activation des lymphocytes B à 48h et 72h après incubation avec le VIH-1. Des travaux similaires ont montré aussi une activation de la prolifération des lymphocytes B par le VIH-1(Schnittman et *al*., 1986) et ceci via l'interaction CD21 et gp120 (Moir et *al*., 2000). La dérégulation de l'organisation nucléaire des gènes *CMYC* et *IGH* peut être due à la stimulation de l'activation des lymphocytes B comme décrit précédemment dans le travail de Fraser.

L'effet de rapprochement des gènes *IGH* et *CMYC* observé après incubation avec le VIH-1, est tardif et durable en comparaison d'une activation par le cocktail : un maximum de colocalisations *IGH-CMYC* est observé à 48h (27% de cellules ayant une colocalisation de ces deux gènes), et non à 24h comme pour l'activation par le cocktail.

Nous pouvons conclure que la faible activation des cellules B induite par le VIH-1 à 24h après traitement ne peut pas être responsable des effets observés.

Nous avons montré aussi que l'interaction gp120 et CD21 impliquée dans la stimulation des lymphocytes B n'est pas responsable de la réorganisation génomique dans le noyau. Le mutant du VIH-1 (NL4.3 delta) n'exprimant pas la gp120 et ne la présentant pas sur son

enveloppe, induit la délocalisation du *CMYC* vers le locus *IGH* de même manière que le VIH-1 non muté.

Nous avons aussi obtenu une surexpression du gène *CMYC* 48h après incubation des lymphocytes B par le VIH-1. La surexpression de *CMYC* coïncide avec le temps où nous avons observé une augmentation très significative des colocalisations *IGH-CMYC*. En revanche, nous n'avons pas déterminé une surexpression de *CMYC* à 24h, temps où nous avons enregistré une activation des lymphocytes B par VIH-1. Cela confirme nos précédents résultats sur l'effet minoritaire de l'activation sur la colocalisation *IGH-CMYC*.

Nous pouvons conclure que la colocalisation *IGH-CMYC* induite par le virus est responsable de la surexpression du gène *CMYC*. Cette cinétique d'incubation avec le VIH-1 et ses effets sur l'expression de *CMYC* et sa délocalisation à proximité d'*IGH* n'a pas été démontrée par d'autres équipes à ce jour.

Nous avons voulu tester un autre composant du surnageant viral VIH-1 qui peut intervenir dans cet effet.

5. La protéine Tat-VIH-1 induit la réorganisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B naïfs

En se référant à la littérature, nous avons choisi d'étudier la protéine Tat-VIH-1 qui nous semblait être la cible principale intervenant potentiellement dans la réorganisation nucléaire dans les lymphocytes B. La Tat-VIH-1 est une protéine virale qui joue un rôle crucial dans la survie et la prolifération du VIH-1 (Jones, 1997). Cette protéine est produite par les cellules infectées et peut pénétrer et agir sur les cellules voisines non infectées (Ferrari et *al*., 2003; Zheng et *al*., 2005). Il a été mis en évidence que la protéine Tat est capable de pénétrer dans des cellules B *in vivo* (Lazzi et *al*., 2002). De plus, il a été déterminé que 30% des souris Tat transgéniques développaient un lymphome de type B (Kundu et *al*., 1999).

Nous avons montré que la protéine Tat seule peut induire la délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus *IGH*. Nous avons confirmé les résultats obtenus en testant l'effet de la protéine Tat sur un autre gène contrôle la Beta-Globine à la place du gène *CMYC* qui ne

se déplaçait pas après incubation avec Tat, et en utilisant un mutant de la protéine Tat (Tat C22). Nous avons choisi ce mutant de Tat comme témoin car la mutation de la protéine Tat par substitution des acides aminés au niveau de la cystéines C22, (essentiel pour l'activité enzymatique de Tat) abolit sa fonction transactivatrice (Ruben et *al*., 1989). En effet, Il a été montré que la mutation de l'un des ces cystéines : C22, C27, C37 ou C25 au niveau de la région cystéine codante pour la protéine Tat empêche la replication et la prolifération virale: car la délétion de n'importe quelle cystéine abolit le mécanisme de transactivation.

La protéine Tat mutante ne provoquait pas une délocalisation importante du gène *CMYC*. Nous avons analysé un faible effet sur le nombre de cellules avec une colocalisation *IGH*/*CMYC* au bout de 24h d'incubation avec Tat mutant (12% par rapport à 4,7% pour les lymphocytes B naïfs).

Nous pouvons conclure que la transactivation induite par Tat est le facteur principal dans la délocalisation observée, mais qu'il existe aussi d'autres facteurs pouvant intervenir d'une manière très faible sur la colocalisation du *CMYC*. En effet, nous avons observé une augmentation de la colocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B à 24h après incubation avec le Tat mutant (12,76% de cellules avec *CMYC* délocalisée vers *IGH*, le double par rapport au témoin négatif 4,7%). Ce retour a la valeur initiale prouve une participation de la fonction transactivatrice dans ce processus.

Nous avons confirmé l'effet de la protéine Tat sur la réorganisation des loci *IGH* et *CMYC* en la déplétant du surnageant viral VIH-1 par immunoprécipitation. Comme la déplétion complète de Tat n'aboutit pas à une inhibition des taux de colocalisation *IGH-CMYC* (14,84%) et un retour à la valeur initiale analysée dans les lymphocytes B naïfs (4,7%), nous supposons la présence d'un autre composant viral qui peut intervenir en même temps que Tat dans la désorganisation nucléaire.

Notre travail montre que la position du locus *IGH* (14q32) n'est pas affectée ni par l'infection virale (EBV et VIH-1) ni par l'incubation avec la protéine Tat. Seul le locus *CMYC* (8q24) change de position dans le noyau. Il semble donc que ce dernier, lorsqu'il est délocalisé, occupe une position illégitime qui favorise sa translocation avec le locus *IGH*.

Il a été déjà admis que la protéine Tat peut directement stimuler la fonction cellulaire B, comme elle peut stimuler les cellules de sarcome de Kaposi et des cellules T (Ensoli et *al*.,

1990; Li et *al*., 1993; Ott et *al*., 1997). Nous avons déterminé que la protéine Tat est incapable de stimuler les lymphocytes B contrairement à ce qui a été déjà mentionné dans l'article de Huang (Huang et *al*., 1997). En effet, l'équipe de Huang ont montré que l'incubation des PBMCs avec la Tat exogène seule pouvait activer les cellules B. Ils ont suggéré que la Tat pouvait contribuer à l'hyperactivation des cellules B pendant un stade précoce de l'infection par VIH-1 et que l'activation induite par Tat provoquait la mort des cellules B par la surexpression du gène Fas pendant un stade tardif de l'infection par VIH-1.

Il faut noter que l'équipe de Huang, n'a pas étudié directement l'effet de Tat sur les lymphocytes B. En effet, ils ont incubé les PBMCs avec Tat et ils n'ont vérifié l'activation des cellules B que par l'intermédiaire du niveau d'expression du gène FAS. Ils n'ont pas vérifié la présence des récepteurs de l'activation membranaire des cellules B par cytométrie.

Nos résultats montrent clairement que les effets de délocalisation du gène *CMYC* induit par Tat n'interviennent pas dans l'activation des cellules B.

Nous avons observé une surexpression du gène *CMYC* après incubation des lymphocytes B par la protéine Tat recombinante. Des travaux ont montré que la protéine Tat est capable de déréguler l'expression du gène *CMYC in vitro* (Astrin and Laurence, 1992). En effet, la protéine Tat est reconnue comme transactivatrice des gènes viraux et cellulaires (Ju et *al*., 2009; Mahlknecht et *al*., 2008; Nekhai et *al*., 2007). Cette protéine peut déréguler l'expression de certains gènes en se fixant à une séquence cible de l'ARN cellulaire appelée TAR induisant l'activation de leur transcription (Laspia et *al*., 1989; Wei et *al*., 1998).

Nous avons montré que dans la majorité des cellules avec colocalisation *IGH-CMYC*, loci *CMYC* colocalisé avec *IGH,* colocalise aussi le site nucléaire de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II. Ce positionnement inapproprié du locus *CMYC* est vraisemblablement lié à sa dérégulation. Nos résultats sont similaires à ceux d'Osborne et ces collaborateurs. En effet, cette équipe a déterminé que l'activation des lymphocytes B chez la souris induit la colocalisation d'IgH et cMyc. Les deux gènes pourraient partager la même usine de transcription.

Nous avons déterminé une concentration de Tat dans le surnageant viral VIH-1 similaire à celle déterminée *in vivo* par l'équipe Westendorp (Westendorp et *al*., 1995). Nous avons montré que l'effet de Tat sur la perturbation de l'organisation nucléaire et la délocalisation du locus *CMYC* et *IGH* est dose-dépendante de la protéine.

La délocalisation de *CMYC* à proximité du locus *IGH* peut être due à une propriété intéressante de Tat qui contribue à la modification de la structure de la chromatine. Des travaux ont montré que Tat-HIV-1 intervient dans diverses étapes du remodelage de la chromatine par le recrutement d'un grand nombre de facteurs cellulaires. La structure de la chromatine peut être modifiée par le déroulement des nucléosomes et l'accessibilité à la transcription. La structure du nucléosome peut être modifiée en régulant l'acétylation des histones (Verdone et *al*., 2005).

Nos résultat confirment que Tat est capable de modifier la structure de la chromatine et ceci en changeant la distribution des histones H3K9 acétylées ainsi que les histones triméthylées dans les noyaux des lymphocytes B traités par la protéine. En revanche nous n'avons pas observé des modifications significatives dans la région 8q24 codant pour le gène *CMYC*. Nous pouvons conclure que les modifications de la position et l'expression du gène *CMYC* dans les lymphocytes B traités par Tat n'est pas directement lié ni à l'acétylation, ni à la triméthylation des histones H3K9 dans la région 8q24 codante pour le gène *CMYC*.

Ces résultats nous permettent donc de proposer un modèle explicatif de l'effet des virus EBV et VIH-1 (protéine Tat) sur la réorganisation spatiale des gènes *CMYC* et *IGH* et leurs rapprochement. La proximité prolongée des gènes *CMYC* et *IGH* peut faciliter leur translocation, car le mécanisme NHEJ qui est le responsable principal des translocations durant la SHM, nécessite la proximité des partenaires de la recombinaison (Figure 62).

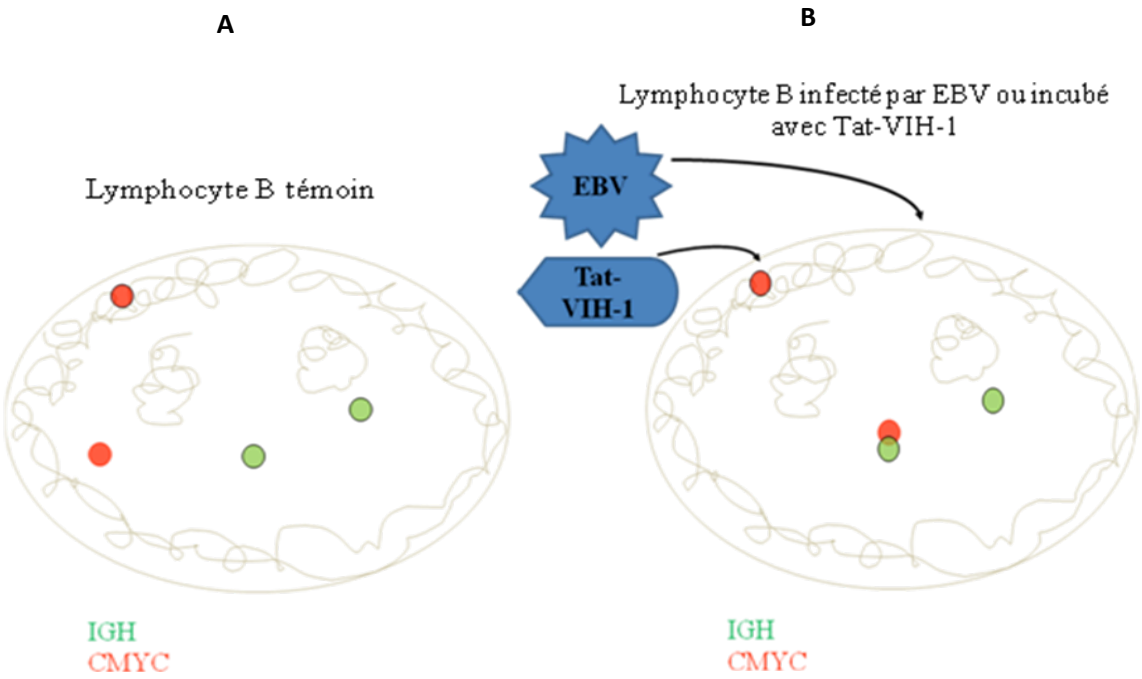


Figure 58. Modèle de la réorganisation spatiale des gènes *IGH* et *CMYC*. (A) Dans les lymphocytes B témoins, le locus *CMYC* (en rouge) est localisés du côté péricentral du noyau, le locus *IGH* (en vert) se retrouve au centre du noyau. **(B)** L'infection par EBV ou le traitement par la protéine Tat, induit un rapprochement ou colocalisation des loci *CMYC* et *IGH* vers le centre du noyau.

PERSPECTIVES

Perspectives

Dans le cadre de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence l'important rôle des virus EBV et VIH-1 dans la modification de l'organisation spatiale du génome au sein des noyaux des lymphocytes B normaux avec une implication des deux gènes *CMYC* et *IGH*. Cette réorganisation des gènes *IGH* et *CMYC* étudiés dans les noyaux B infectés, pourrait être un facteur favorisant la survenue d'une translocation t(8;14) et le développement d'un BL.

Il faut noter que la méthode de FISH utilisée pour déterminer la délocalisation des gènes ne permet pas de distinguer si la colocalisation des gènes *CMYC* et *IGH* observée dans certains cas est liée à une proximité spatiale ou une translocation déjà effective. Les études envisagées consistent donc à montrer directement, si l'EBV et le VIH-1 augmentent les taux de translocation t(8;14). Nous allons essayer de montrer les mécanismes moléculaires par lesquels les virus EBV et VIH-1 peuvent être impliqués dans l'oncogenèse du BL. Pour cela nous allons tout d'abord, traiter les lymphocytes B incubés avec l'EBV ou VIH-1 avec une méganucléase induisant des cassures double-brin de l'ADN dans le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) pour favoriser les translocations. Ensuite nous allons utiliser la technique de LDI-PCR (Long-Distance Inverse PCR) ainsi que la microscopie confocale (FISH) afin de détecter ces translocations. Ces études seront importantes pour comprendre le processus d'oncogenèse.

- **Détection des translocations par LDI-PCR**

Les translocations se produisent de manière très rare. Afin de les détecter dans une population cellulaire il faut développer une méthode de détection très sensible. Nous allons utiliser une méthode développée pour étudier les taux des translocations dans le gène *IGH*: LDI-PCR de l'ADN total des cellules B (Sonoki et *al*., 2004; Willis et *al*., 1997).

Cette méthode consiste à traiter l'ADN des lymphocytes B par les enzymes de restriction qui créent des fragments du gène *IGH* d'une longueur de 2 à 10 kbases. La longueur du fragment d'ADN augmente si le gène *CMYC* est inséré. Après une digestion, les fragments d'ADN seront circularisés avec une ligase T4, enfin une PCR sera réalisée avec des oligonucléotides spécifiques pour les fragments circularisés du gène *IGH* en présence d'une polymérase processive qui peut dupliquer les longs fragments de l'ADN. L'analyse de la longueur des fragments de PCR par électrophorèse montrera si les fragments portent le gène *CMYC* inséré.

Il faudra en premier temps, élaborer la méthode de LDI-PCR pour pouvoir analyser directement les taux des translocations du gène *CMYC* dans le chromosome 14, locus du gène *IGH* (Sonoki et *al*., 2004; Willis et *al*., 1997) sur le modèle des cellules de la lignée du BL. Il faudra déterminer le seuil de sensibilité de cette méthode (seuil de 10-6 cellules avec la translocation comme observé après l'incubation avec des virus). La mise au point de cette technique nous permettra d'étudier si les taux de translocation augmentent après l'incubation des cellules B naïves avec le VIH-1 ou l'EBV. Des cellules B naïves serviront comme témoin. Les données de LDI-PCR seront confirmées par l'hybridation in situ suivi par la microscopie à haut débit (Agrawala et *al*., 2010).

- **Induction des cassures double brin par les méganucléases**

Les CDBs induisant ultérieurement les translocations sont assez rares. Nous proposons de créer un modèle humain avec un taux de cassure élevé sur une région spécifique pour étudier des translocations induites par l'EBV et le VIH-1. Ce modèle sera basé sur l'utilisation des méganucléases.

Les méganucléases sont des enzymes soit naturelles soit modifiées par mutations, capables de provoquer des CDBs de l'ADN dans un locus unique du génome. Le site de reconnaissance est assez long (12-40 bases). Une méganucléase qui reconnaît un "hot spot" de recombinaison dans le gène *IGH* peut mimer une situation naturelle de la recombinaison au cours de la maturation des anticorps. Cette méthode a déjà été utilisée par l'équipe de Chiarle pour révéler les hot-spots de translocation dans les gènes *IGH* et *CMYC* (Chiarle et *al*., 2011).

Comme la méthode a été développée sur les lymphocytes B des souris (Chiarle et *al*., 2011), il faudra l'adapter aux lymphocytes B humains. Nous allons choisir une méganucléase qui reconnaît un des hot-spots sur le gène *IGH*.

Nous ajouterons la méganucléase aux lymphocytes B humain traités par le VIH-1 ou par l'EBV et aux lymphocytes naïfs comme témoin. Ensuite, nous évaluerons les taux des translocations dans les lymphocytes B par la méthode de LDI-PCR décrite ci-dessus.

- **Les mécanismes moléculaires du déplacement du gène *CMYC* induit par l'EBV et le VIH-1**

Pour révéler les mécanismes moléculaires de délocalisation du locus *CMYC* dans la région *IGH* induit par les virus, il faudra étudier plusieurs mutants de l'EBV et du VIH-1, pour pouvoir exclure le rôle de certaines étapes du cycle viral dans les effets observés.

Les lymphocytes B isolés du sang des donneurs sains seront incubés avec chaque mutant pour 48 heures (au bout de 48h nous avons enregistré le maximum des taux de colocalisation après incubation des cellules B avec le VIH et l'EBV). Les virus VIH-1 et EBV sans mutation et les lymphocytes B sans traitement serviront de témoins. Après 48h d'incubation, les lymphocytes B seront fixés puis la localisation relative des gènes *CMYC* et *IGH* dans les noyaux par la FISH en 3D (hybridation in situ à fluorescence) avec des sondes spécifiques des gènes *CMYC* et *IGH*, sera évaluée par microscopie confocale. Les images obtenues par microscopie confocale seront analysées avec un logiciel, qui permet de mesurer les distances inter-géniques. Les allèles des gènes *IGH-CMYC* ayant 1μm ou moins entre eux seront considérées comme les allèles colocalisés des gènes *IGH* et *CMYC*. Au moins 100 noyaux seront analysés par condition et les statistiques appropriées seront faites pour quantifier le nombre des cellules B ayant une colocalisation des gènes *IGH-CMYC*.

Nous utiliserons LDI-PCR ou le traitement par méganucléase pour les témoins afin de confirmer que le rapprochement des gènes *CMYC* et *IGH* observé par FISH est vraiment lié aux taux élevés des translocations.

Pour obtenir les mutants de l'EBV, une série des mutants de ce virus par la méthode HV-BAC (Feederle et *al*., 2010) sera réalisée. Il faudra choisir des mutants n'ayant pas les gènes impliqués dans l'oncogenèse associée à l'EBV (EBNA3C, EBNA3A, EBNA2, LMP1 mutants, incapable d'effectuer une transactivation).

Concernant les mutants du VIH-1, nos collaborateurs de l'ENS Cachan ont proposé de nous les fournir. Il faudra choisir et construire encore 2 ou 3 mutants de VIH-1 (mutant sans la protéine Tat ou sans la protéine Nef, dont le rôle a été montré important dans l'oncogenèse induit par le virus), pour étudier le rôle des différentes étapes du cycle viral dans la délocalisation du gène *CMYC*.

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Lymphocytes B normaux

Des prélèvements sanguins sont recueillis à partir de donneurs non atteints de LMNH avec l'accord de ceux-ci (Hôpital Saint Louis). Le sang utilisé contient généralement $8,6x10^9$ leucocytes/L dont environ 20 % sont des lymphocytes. L'isolement des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) se fait par centrifugation sur gradient de Ficoll. Pour réaliser le gradient de Ficoll, on dilue le sang au demi avec du PBS. Après centrifugation, on récupère l'anneau de lymphocytes. Cet anneau est lavé trois fois avec du PBS stérile puis les cellules obtenues sont remises en suspension dans un milieu de culture contenant en milieu RPMI1640 supplémenté de 10% de sérum et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et incubées dans une étuve à 37°C sous 5% de CO2. La pureté des cellules a été évaluée par double marquage B/T anti-CD19/anti-CD3 analyse en cryométrie en flux. Les lymphocytes B ont été activés par l'anti CD40, anti IgM et IL4, la stimulation des cellules est contrôlée en cytométrie de flux par un marquage anti-CD23, anti-CD69 et anti CD80. Les lymphocytes B naïfs ont été incubées avec la protéine Tat recombinante fourni par NIH AIDS Research and Reference Reagent program, USA de l'ordre de 250ng/1ml de milieu/10^6 cellules comme ca été décrit dans l'article de Lili Huang (Huang et *al*., 1997).

1.2. Lignée lymphoblastoïde EBV+ RPMI 8866

Les lignées lymphoblasoïdes (LCLs) RPMI 8866 obtenues après immortalisation de lymphocytes B normaux par EBV. La lignée lymphoblastoïde RPMI 8866, a été fournie par l'IARC. Cette lignée a été cultivée en milieu RPMI1640 (PAA) supplémenté en L-glutamine (2mM, PAA), en pyruvate de sodium (1Mm, PAA), en glucose (20mM), en pénicilline (100 U/ml, PAA), en streptomycine (100µg/ml, PAA) et en sérum de veau fœtal inactivé (SVF, 10%). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO2 et saturée en eau.

1.3. Surnageant viral EBV

Le surnageant viral a été aimablement fourni par Docteur Irène JOAB, Hôpital Paul Brousse. Une lignée B de singe ouistiti (marmouset) transformée par EBV a été utilisée pour la production virale. Les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 complet contenant 10% sérum de veau fœtal inactivé, pénicilline / streptomycine à 100U/ml et 100 pg/ml, et amphotéricine B à 0,5 pg/ml, à 37°C en présence de 5% de CO2. Quarante-huit heures plus tard, les cellules ont été remises en suspension dans un milieu complet à 10^6 cellules/ml. Les cellules ont été Centrifugées à 600xg pendant 10 min à 4°C afin de séparer le surnageant contenant l'EBV des cellules. Le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,45 micron. Enfin les aliquotes ont été conservé à -70°C. Cette méthode a été montrée pour produire des titres élevés de virus.

1.4. Surnageant viral VIH-1

La souche pNL4.3 (p pour la forme du plasmide), contient le génome NL4.3 du virus VIH-1 (Adachi et *al*., 1986). La souche mutante pNL4-3 Δ env a été dérivée de pNL4.3, en supprimant la région Nhel-BsaBI du gène env. Ces deux souches viraux utilisées pour ces travaux ont été fourni par Docteurs : Stéphanie Bury Moné et Frédéric Subra de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan (ENS Cachan) (LBPA– UMR CNRS 8113). Les rétrovirus ont été produit par transfection des cellules Hek 293T (Hek: human embryonic kidney) par le phosphate de calcium (Chen and Okayama, 1987; Manic et *al*., 2012) avec les modifications suivantes. Brièvement, les cellules ont été étalées dans une flasque de 75 cm² et maintenues en culture pendant 3 jours. Deux heures avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu frais. Pendant ce temps, on précipite en mélangeant 16pg de vecteur navet plasmidique (pNL4-3 ou pNL4-3 Δenv) avec 1ml de 0,25M CaCl2 et on ajoute le mélange de la solution obtenue à 1 ml de HEPES solution saline tamponnée (NaCl 280mM, KCl 10mM, 1,5mM Na2HPO4, HEPES 50mM, pH7), on vortex. Le mélange a été incubé pendant 20 min à température ambiante, puis ajouté aux cellules. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu frais. Les surnageants ont ensuite été récoltées 48 et 72h après la transfection, centrifugé pendant 5 min à 2700g et centrifugé à 1730g pendant 30min. Les aliquots ont été stockés à -80°C. Une quantification de la protéine viral P24 a été effectuée à l'aide d'un dosage ELISA P24 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc) selon les recommandations du fabricant. La production contient généralement 0,5-1ng p24/ µl. Toutes

les manipulations avec le VIH-1 étaient effectuées sous les conditions de la protection biologique niveau 3.

1.5. Protéine Tat de VIH-1

La Tat recombinante a été fourni par NIH AIDS Research and Reference Reagent program, USA. La Tat recombinante avec une mutation dans la cystéine 22 (Tat C22) a été acheté chez Abcam, UK, (ab83352).

2. Infection des cellules B par EBV

Les cellules B ont été resuspendue dans la suspension virale (surnageant de la lignée B95-8) à raison de 2 millions de cellule par 1ml de milieu dans un tube 15ml stérile. Ensuite le tube a été incubé une heure à 37°C avec agitation légère toutes les 15 minutes. Le tube a été centrifugé légèrement pour le transférer dans le milieu de culture complet contenant RPMI1640, 10% de sérum et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Enfin, la suspension cellulaire a été distribuée dans une plaque à 6 puits. Les cellules ont été observées tous les jours par microscopie afin de vérifier si il ya eu formation d'agrégats de cellules transformées.

3. Infection des cellules B par VIH-1

Les cellules B ont été resuspendues dans un milieu RPMI 1640 complet de l'ordre de 10^6 de cellules par 1ml de milieu. Ensuite, le surnageant viral a été rajouté 275µl de surnageant viral/1ml de milieu/10^6 cellules (à peu pré 10^9 particules virales/10^6 cellules). La suspension cellulaire a été distribuée dans une plaque de 6 puits ou dans des flasques de 25 cm^2 en fonction de l'expérimentation prévue et incubé à 37°C et 5% CO_2. L'infection avec le VIH-1 a été effectuée sous les conditions de la protection biologique niveau 3.

4. Activation des cellules B par les cytokines

Les lymphocytes B ont été activés par un mélange d'anti-CD40 humain (G25.8, Biolegend, Canada), anti-IgM humain (DA4.4, fourni par Joëlle Wiels (UMR8126, Institut Gustave Roussy)) et IL4 humain (Sigma). Les cellules B (10^5 cellules/ml) triées le jour même, ont été incubées dans le milieu RPMI avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques, contenant 1 µg/ml anti-human-CD40 (G28.5), 1/500 dilution de l'anti-human-IgM monoclonal (DA4.4), produit

sur les souris (environ 20 mkg/ml) + 20 ng/ml IL-4 humain recombinant. Les cellules traitées ont été incubées à 37°C et 5% CO_2. L'activation des cellules a été contrôlée en cytométrie de flux (FACS) par un marquage avec anti-CD23-PE, anti-CD69-PerCP-Cy5.5 et anti-CD80-APC (Biolegend, Canada), 24h, 48h, et 72h après activation. Le commencement de la prolifération des cellules B activées a été confirmé par une expérience d'incorporation du BrDU 72h après activation sur les cellules fixées avec éthanol par des méthodes standards suivie par une analyse de l'ADN par FACS (marquage avec iodide de propidium). L'expérience d'incorporation de BrdU a été effectuée en collaboration avec l'Institut Jacques Monod (Paris) par Caroline Brossas.

5. Incubation des lymphocytes B avec la protéine Tat recombinante

Les lymphocytes B naïfs ont été incubés avec la protéine Tat recombinante ou avec le mutant de Tat C22 de l'ordre de 250ng/ml du milieu/10^6 cellules, comme ça était décrit dans l'article de Lili Huang (Huang et *al*., 1997). Dans les expériences sur la dose-dépendante de l'effet du Tat on a utilisé les concentrations de 10, 15 et 250ng/ml de Tat.

6. Hybridation *in situ* fluorescente (FISH) sur des lymphocytes B fixés

6.1. Principe

Le principe de l'hybridation in situ fluorescente repose sur l'hybridation d'un fragment d'ADN (sonde) spécifique et complémentaire de la région génomique étudiée. Cette sonde est marquée par un fluorochrome.

6.2. Conditionnement des cellules

Les cellules en suspension ont été fixées sur des lamelles 15x15mm préalablement traitées avec la polylysine (Poly-D-lysine hydro-bromide (Sigma)), pour que les cellules adhèrent à la surface des lamelles. Les cellules étaient ensuite traitées par la solution hypotonique (0,3XPBS, 1 minute d'incubation), fixées par le paraformaldéhyde 4% et lavées avec du PBS. La fixation et l'hybridation des cellules ont été effectuées comme décrit par l'équipe (Solovei and Cremer, 2010). La membrane des cellules était perméabilisée avec le Triton X100 (10 minutes) ensuite la lamelle était incubée dans 20% du glycérol pour une heure à la température ambiante ou pour la nuit à 4°C. Les lamelles étaient traitées trois fois en alternant bain d'azote liquide et de glycérol 20%, suivi par une incubation dans un bain de HCl 0,1N pendant 20 minutes. Après les lavages avec du 2XSSC les cellules fixées ont été

incubées avec de l'RNase (100mg/ml) 30 minutes à 37°C dans une boîte humide. Les lamelles étaient lavées avec 2XSSC. Enfin, les lamelles étaient conservées dans une solution 50% de formamide/2XSSC à 4°C (les lamelles peuvent être conservées jusqu'à 3 mois en ces conditions).

6.3. Sondes utilisées

Les sondes ont été choisies en fonction du remaniement chromosomique recherché : les gènes colocalisés apparaissent alors sous forme d'un signal fluorescent dont la couleur dépend du fluorochrome utilisé. Les sondes utilisées sont des sondes commercialisées par Blue FISH France (LSI *IGH*/*CMYC*/Beta-Globine, Blue Fish, France). Les sondes commandées ont été couplé à Spectrum Green (sonde pour la région du gène *IGH*) ou Spectrum Orange (sondes pour les régions des gènes *CMYC* et Beta-Globine).

6.4. Technique d'hybridation

La dénaturation de la sonde et de l'ADN cellulaire se font simultanément par deux approches différentes : la sonde est dénaturée à 75°C pendant 5 min et l'ADN cellulaire l'est à 75°C dans un bain de formamide déionisée 70%/2XSSC. Après la dénaturation, la sonde est placée sur la lamelle. L'hybridation dure entre 24h et 48h, en atmosphère humide à 37°C. Les lavages s'effectuent dans des bains successifs de formamide 50%/2SSC, 0,2XSSC, 0,1% NP-40/0,2XSSC et 2XSSC. Les lamelles ont été incubées 5min avec le To-pro3 avec une dilution de 1/1000. Le To-pro3 est un agent intercalant colorant l'ADN et le nucléole en bleu : le nucléole apparaît donc sous forme de petites sphères qui reflètent la condensation de la chromatine. Nous avons lavé 3 fois 5 minutes à température ambiante avec du PBS. Pour le montage lame-lamelle nous avons déposé 10 µl de milieu de montage (Vectashild) (Vector Labs, Etats-Unis). Les bords de la lamelle ont été scellés avec du vernis à ongles transparent. Nous avons laissé sécher 3 minutes. Les cellules sont maintenant prêtes pour la microscopie confocale.

6.5. Microscopie confocale

Les cellules ont été observées sous microscopie confocale de type Zeiss LSM 510 à l'Institut Gustave Roussy avec un objectif 63x 1,4 à immersion, Une représentation 3D des gènes (*CMYC* et *IGH*) est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées 2D, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux. Le rayon laser excitateur pénètre

dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes. Il y a alors émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de notre échantillon. Grâce à un diaphragme variable ou «pinhole» qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrages des longueurs d'ondes différentes (458,488, 543 et 633 nm) afin d'améliorer la qualité de l'image, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateurs. Le choix du format de « scan » est de 512 points par 512 lignes de scan (512x512).
Les gènes étudiés sont visualisés sous forme de spots fluorescents : le gène *CMYC*/Beta-Globine (633nm) donne un signal rouge, le gène *IGH* (543nm) un signal vert, le noyau (488nm) un signal bleu.

6.6. Analyse des images en microscopie confocale (microscope confocal Zeiss)

La distribution des gènes dans les noyaux des cellules est analysée avec le processus d'image semi automatique et l'outil d'analyse décrits précédemment (http://www.biomedcentral.com/1471-213X/12/30). Ces outils sont basés sur des librairies ITK (http://www.itk.org WebCite), interfacé avec le langage Python (Lehmann et *al*., 2006) les images sont automatiquement redimensionnées en taille voxel constante (0.284x0.284x0.36 um) et traitées pour être segmentées.

Ce logiciel a été adapté et réglé par Gaetan Lehman spécialement pour nos travaux. Afin de pouvoir mesurer automatiquement les distances entre les différents gènes marqués : *IGH-CMYC, IGH-IGH* et *CMYC-CMYC* ainsi que les distances qui séparent les gènes de la membrane nucléaire: *IGH*-noyau et *CMYC*-noyau.

Le logiciel fonctionne en trois étapes successives :

1ère étape : le débruitage ou «filtrage » des images permet d'isoler le signal spécifique du bruit de fond comme illustré sur la figure 58 (traitement informatique de l'image inclus le logiciel de microscopie).

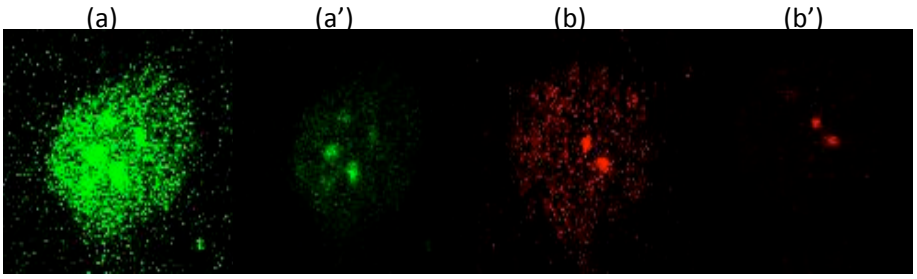


Figure 59. Débruitage des images par le logiciel : (a) *IGH* non filtré, (a') *IGH* après débruitage (filtration), (b) *CMYC* non traité, (b') *CMYC* après débruitage (filtration).

2éme étape : la segmentation. Elle permet de repérer les objets dans l'image. Cette étape est fondée sur le « seuillage » des pixels en fonction de leur intensité. Le logiciel effectue une séparation par une ligne virtuelle dite « ligne de partage des eaux » pour délimiter le contour des spots, la membrane nucléaire et la périphérie du nucléole du « bruit de fond » de l'image non traitée. La segmentation nous a permi d'étudier la région d'interêt dans notre cas c'est : les gènes *IGH*, *CMYC* et la periphérie nucléaire (Figure 58).

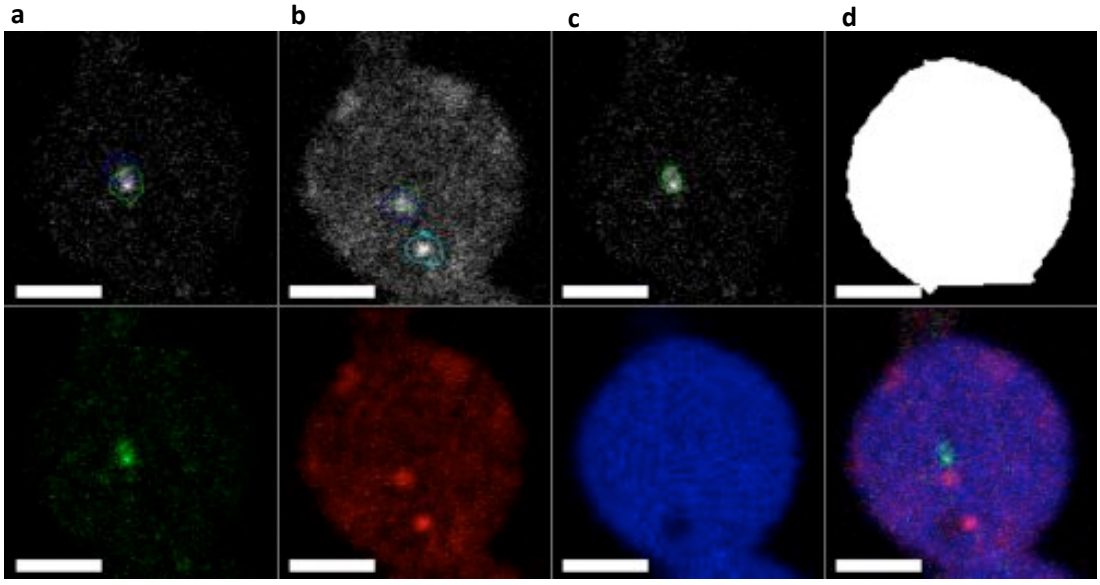


Figure 60. La segmentation nucléaire : (a) Segmentation du gène *IGH* (b) Segmentation du gène *CMYC* (c) Segmentation du noyau (d) merge.

3éme étape : La mesure des distances. La position des spots est mesurée par rapport à leur centre. La distance spots-noyau et spots-nucléole est mesurée par une carte de distance du noyau ou nucléole, schématisée ci-dessous (Figure 61).

Tous les noyaux ont été normalisés par le logiciel. On a attribué la valeur zéro pour la membrane nucléaire et la valeur 1 pour le centre du noyau. Le noyau est divisé en cinq zones concentriques et égales. Chaque anneau représente 20% du volume nucléaire. Si un gène est localisé dans le 2ème anneau, il est situé dans l'anneau numéro 2 (correspondant à 10%-20% du volume nucléaire) et donc plus proche du noyau que de la membrane. Cette évaluation « virtuelle de la distance » permet de s'abstraire des variations de volume des différents noyaux étudiés.

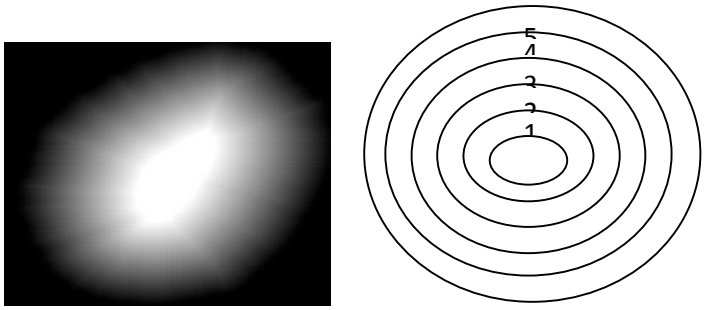


Figure 61. **Carte de distance** : Mesure de la position des gènes dans le noyau

6.7. Analyses statistiques

Les mesures de distances entre *IGH-CMYC*, *IGH*-membrane nucléaire, *CMYC*-membrane nucléaire et *IGH*--Beta-Globine des lymphocytes sont obtenues en utilisant le logiciel développé à l'INRA (Lehman et *al*., 2006) et interprétées dans un tableau Excel.

Les distributions de ces distances dans les cellules B : activées, infectées par EBV, incubées avec VIH-1et traitées avec le Tat recombinant et mutant ainsi que dans la lignée LCL8866 sont comparées par le test statistique binomial.

Le test binomial permet de comparer les fréquences de colocalisations des alléles *IGH* et *CMYC* au cours des cinétiques étudiées par rapport au témoin négatif (les cellules B naives) et entre les cellules provenant de deux populations différentes (le cas des cellules traitées avec le Tat recombinant, le Tat mutant et après immunoprécipitation de Tat). Nous avons considéré que la différence est statistiquement significative lorsque la p-val<0,05.

7. Immunofluorescence

Pour les expériences d'immunofluorescence, le même protocole du Fish en 3D est appliqué pour les étapes de fixation des cellules, perméabilisassions, blocage et immunodétection. Pour l'immunomarquage de la forme active de l'ARN polymérase II, l'anticorps utilise est un anticorps polyclonal de lapin (Active Motif, Carlsbad, CA). Pour le marquage des histones acétylées (H3K9 acétylée) et les histones triméthylées (H3K9 triméthylée), nous avons utilisé les anticorps : de lapin (Up state anti-trimethyl-Histone H3 (lys 9)) et H3 acétylatée at Lys 9 (mark of active chromatin): Millipore 17-658 histone.

8. Extractions d'ARN, RT et qPCR

Les ARN totaux des cellules ont été extraits immédiatement à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen). Les ADN complémentaires (ADNc) de ces ARN ont été synthétisés à l'aide du Kit Revert AID H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) en suivant les instructions du fournisseur. Ces ADNc ont alors été analysés par PCR quantitative (qPCR). Le mélange de qPCR comprend le FastStart Universal SYBR Green Master (RoX/Roche)/dNTP (Eurogentec, Liège, Belgique), amorces et ADNc. La détection et la quantification des ARN a été faite à l'aide des amorces suivantes :

CMYC F: 5'-CCACCAGCAGACTCTGA-3'
CMYC R: 5'-GCAGAAGGTGATCCAGACT-3'

Zebra1 F: 5'-GCG CAG CCT GTC ATT TTC AG-3'
Zebra1 R: 5'-ACG ACG CAC ACG GAA ACC ACA AC -3'

GAPDH F: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'
GAPDH R: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'

9. Cytométrie en flux (FACS)

Afin de vérifier la pureté et l'activation des lymphocytes B, on procède par un marquage membranaire des cellules à l'aide des anticorps CD19 couplés à l'FITC, CD23 couplés à PE, CD69 couplés à PerCP-Cy5.5 et CD80 couplés à APC (Biolegend, Canada), suivant les recommandations du producteur. Les cellules B (500 000 cellules par condition) ont été lavées avec du PBS, resuspendues en 50 µl du PBS et incubées 20 minutes à 4°C et à

l'obscurité avec un anticorps ou avec les 4 anticorps en même temps (2,5 ou 10 mkl de chaque anticorps en fonction des recommandations du producteur), suivi par un lavage avec PBS, resuspension des cellules dans du PBS et analyse avec la cytomètre LSRII (BD Biosciences) et le logiciel de ce cytomètre. Des lymphocytes B naïfs non-marqués ont été utilisés chaque fois comme témoin négatif.

10. Dot Blot

Pour effectuer un Dot Blot, on a préparé des différentes concentrations de la protéine Tat recombinante (0,1ng ; 0,5ng ; 1,5ng ; 3ng ; 5ng et 10ng). Le surnageant viral contenant Tat a été utilisé sans dilution. L'ensemble à été mis à bouillir 10 minutes puis centrifugé rapidement. Ensuite des gouttes de 10µl des différentes concentrations de protéine recombinante ont été déposées par ordre décroissant sur la membrane de nitrocellulose ainsi que 10µl de notre surnageant viral. La membrane a été bloquée avec du lait en poudre 5% en TBS (50 mM de Tris, 0,5 M de NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire anti HIV Tat (vN-21) : sc-17439 (dilué au 1/1000^{éme}, Santa Cruz Biotechnologie, USA) pendant 1 heure à température ambiante dans TBS. Par la suite la membrane a été lavée 3 fois (10 minutes chaque lavage) dans du TBS. La membrane a été incubée avec un anticorps secondaire anti-goat couplé à HRP (horse-reddish peroxidase) pendant 1 heure à température ambiante en TBS et lavée 3 fois (10 minutes) dans TBS sur rocker. La membrane a été révélée par le kit (Millipore, Etats-Unis) selon le protocole du producteur.

11. Immunodépletion de la protéine Tat du surnageant contenant le VIH-1

L'immunodéplétion de la protéine Tat du surnageant des cellules 293T productrices du VIH-1, souche NL4.3, a été réalisée avec Dynabeads Protein G (des billes magnétiques couplées à la protéine G (Invitrogen, Life Technologies, Etats-Unis)) par le protocole du producteur en utilisant l'anticorps anti-Tat-VIH-1(vN-21), sc-17439 (Santa Cruz Biotechnology, Etats-Unis). Brièvement, pour chaque échantillon 10 mkg de l'anticorps ont été dilué en 200 mkl PBS ensuite pré-incubé avec 1,5 mkg des billes magnétiques pour 10 minutes avec rotation. Les billes magnétiques avec l'anticorps attaché étaient lavées avec du PBS et incubées avec 1 ml du surnageant viral (sous les conditions de la protection biologique niveau 3) pour 1 heure avec rotation à 4°C. Les billes avec l'anticorps et la Tat étaient

précipitées avec un aimant, et le surnageant était immunodéplété pour la deuxième fois (re-incubation avec des billes couplées aux anticorps anti-Tat).

12. Immuno-précipitation de chromatine (CHIP)

La fixation des cellules, la lyse, la sonication et l'immunoprécipitation ont été réalisé à l'aide des réactifs et selon le protocole du kit CHIP-it (Active Motif, Carlsbad, CA). L'immunoprécipitation des histones acétylées et triméthylées a été effectuée à l'aide d'anticorps : H3 acétylées au niveau de la Lys 9 (mark of active chromatin): Millipore 17-658, histone H3 3-triméthylée au niveau de la Lys 9 (mark of silent chromatin): Millipore 17-625 total H3, référence: Millipore 17-10254.

ANNEXES

RESUME DE L'ARTICLE

Cet article a été accepté dans le journal BLOOD.

Ces travaux ont consisté à étudier la localisation génique des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGH*), des oncogènes *CMYC* et *CCND1*, impliqués dans la transformation maligne des cellules B naïves quiescentes, respectivement, dans le lymphome de Burkitt et le lymphome du manteau. Après hybridation in situ avec des sondes spécifiques puis analyse en microscopie confocale (tridimensionnelle), les distances respectives 1/entre chaque gène d'intérêt, 2/entre chaque gène et la membrane nucléaire et 3/ entre chaque gène et le nucléole ont été évaluées à l'aide d'un logiciel développé en collaboration avec l'INRA (Jouy en Josas).

Nous avons observé une modification significative de l'organisation nucléaire des gènes *CMYC*, *CCND1* et *IGH* durant la différentiation lymphocytaire B : les deux allèles *IGH,* en particulier, ont une distribution spatiale nucléaire très modifiée avec une proximité nucléolaire qui pourrait être liée au statut transcriptionnel du gène *IGH*. Les gènes cibles partenaires (*CMYC, CCND1*) impliqués dans la translocation, en raison de leur contiguïté avec *IGH*, sont alors délocalisés de leur « domaine chromosomique » périphérique vers le nucléole. La délocalisation des gènes impliqués dans la lymphopoïèse pourrait être le mécanisme intervenant dans la lymphomagénèse

Dans cet article, j'ai étudié la localisation nucléaire tridimensionnelle des loci *IGH* et *CMYC* dans les noyaux des lymphocytes B naïfs et dans une lignée Burkitt (Raji). Pour cela, j'ai analysé la localisation des deux loci d'intérêts par rapport à la membrane nucléaire et aussi par rapport au nucléole.

L'étude de la localisation nucléaire des régions 8q24 et 14q32 nous a permis de mettre en évidence une localisation différente de ces deux régions dans les lymphocytes B naïfs. En effet, *IGH* est localisé au centre du noyau à proximité du nucléole contrairement à *CMYC* qui est plutôt péricentral. Dans la lignée Raji nous avons déterminé un déplacement de la région 8q24 vers le centre du noyau dans les lymphocytes malins de la lignée Burkitt, et en particulier vers le nucléole.

Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in chromosome translocation-associated non-Hodgkin B-cell lymphomas

Jeanne Allinne[1+], Andrei Pichugin[1,2+], Olga Iarovaia[1,2,3+], Manel Klibi[1,2], Ana Barat[1,2], Ewa Zlotek-Zlotkiewich[1], Diana Markozashvili[1,2], Natalia Petrova[2,3], Valérie Camara-Clayette[4,5], Elena Ioudinkova[1,2,3], Joëlle Wiels[1,2], Sergey V. Razin[2,3,6], Vincent Ribrag[4,5], Marc Lipinski[1,2] and Yegor S. Vassetzky[1,2,7]

[1]UMR8126, Université Paris-Sud, CNRS, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

[2] LIA1066 « Laboratoire franco-russe de recherche en oncologie », Villejuif, France

[3]Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[4]Institut de Recherche Intégrée en Cancérologie (IRCIV), Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

[5]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) unité (U) 1009, Université Paris Sud, Institut de Cancérologie Gustave Roussy,Villejuif, France.

[6]Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

+These authors contributed equally

[7]Corresponding author

Tel: +33(0)1 42 11 62 83

Fax: +33(0)1 42 11 54 94

Email: vassetzky@igr.fr

ABSTRACT

In Mantle Cell Lymphoma (MCL), one allele of the cyclin D1 (*Ccnd1*) gene is translocated from its normal localization on chromosome 11 to chromosome 14. This is considered as the crucial event in the transformation process of a normal naive B-cell, however, the actual molecular mechanism leading to *Ccnd1* activation remains to be deciphered. Using a combination of 3D- and immuno-FISH experiments, the radial position of the two *Ccnd1* alleles was investigated in MCL-derived cell-lines and malignant cells from affected patients. The translocated *Ccnd1* allele was observed significantly more distant from the nuclear membrane than its non translocated counterpart, with a very high proportion of *IgH-Ccnd1* chromosomal segments localized next to a nucleolus. These perinucleolar areas were found to contain active RNA polymerase II clusters. Nucleoli are rich in nucleolin, a potent transcription factor which we found to bind sites within the *Ccnd1* gene specifically in MCL cells and activated *Ccnd1* transcription. We propose that the *Ccnd1* transcriptional activation in MCL cells relates to the repositioning of the rearranged *IgH-Ccnd1*-carrying chromosomal segment in a nuclear territory with abundant nucleolin and active PolII molecules. Similar transforming events could occur in Burkitt and other B-cell lymphomas.

Key points :

- ➔ We propose a novel oncogenic mechanism linked to the perinucleolar relocalization of chromosomal segments produced during the translocation
- ➔ Translocations in MCL and BL modify the nuclear positioning of *Ccnd1* and *c-myc* and lead to their nucleolin-dependent activation.

INTRODUCTION

Many non-Hodgkin B-cell tumors are strongly associated with recurrent reciprocal chromosomal translocations. These include follicular lymphoma (FL), Burkitt's lymphoma (BL) and mantle cell lymphoma (MCL), three malignancies in which the rearrangement most often implicates the immunoglobulin heavy chain (*IgH*) locus on chromosome 14 along with the *Bcl2* anti-apoptotic gene, the *c-myc* oncogene or the cyclin D1 (*Ccnd1*) gene, respectively. Contrasting with the basal expression level of *c-myc*, both *Bcl2* and *Ccnd1* are silent in normal B-cells. The molecular mechanisms at work in these various B-cell proliferations vary in relation with the stage of maturation of the concerned B lymphocyte, as well as with the location of the cell when the initial cell transformation event occurs[1,2]. Whereas BL and FL arise from germinal center B cells at various stages of maturation, MCL is believed to result from accidental *IgH* recombination events affecting B lymphocytes at the pre-B stage of differentiation in the bone-marrow[3]. Following the prototypical t(11;14)(q13;q32) rearrangement observed in the vast majority of MCL, one *Ccnd1* gene allele becomes juxtaposed with the *IgH* locus on the derivative chromosome 14 (der14) and *Ccnd1* gets constitutively expressed[4]. It is generally assumed that this relies on the action of the potent Eμ enhancer present upstream of *Ccnd1* in the *IgH* locus. The distance between the *IgH* and *Ccnd1* genes can reach several hundreds of kilobases[5,6], however, and the question remains as to the actual molecular basis for *Ccnd1* activation in MCL cells.

In a cell nucleus, intact chromosomes occupy specific territories[7,8]. As a rule but with a few exceptions[9], gene-dense chromosomes and actively-transcribed chromosomal segments packaged in euchromatin tend to be more centrally located than gene-scarce, transcriptionally-inactive heterochromatin segments[10,11,12]. Chromosomal rearrangements such as those observed

in hematopoietic malignancies necessarily trigger changes in the nuclear positioning of numerous genes.

Here, we have investigated the consequences of the chromosomal translocation on the position of the two alleles of the *IgH* and *Ccnd1* genes in the nucleus of MCL cells. The *IgH* and *Ccnd1* genes juxtaposed on the der14 were found more centrally located than the corresponding alleles on the non-rearranged chromosomes, and they were located in very close proximity to at least one nucleolus. Active RNA polymerase II (PolII) molecules were detected in these perinucleolar areas. We propose that the transcriptional activation of *Ccnd1* in MCL cells directly relates to the nuclear repositioning of one *Ccnd1* allele close to a nucleolus via *Ccnd1* interaction with a nucleolus-abundant transcription factor nucleolin. Such a mechanism could also take place in other B-cell proliferations.

METHODS

Cells

The MCL-derived cell lines Granta-519, Jeko, UPN1 and UPN2 and the Raji BL cell-line were grown as described in **Supplementary Methods**. Patients' and control lymphocytes were isolated from peripheral blood, separated by Ficoll-Hypaque density sedimentation and placed in RPMI-1640 supplemented with 10% serum and antibiotics. HeLa and HeLaS3 cells were grown as described[13]. Transient transfection of HeLa cells was performed using Lipofectamine2000 according to manufacturer's instructions.

Ethics Statement

The human samples were obtained with the written consent of patients in accordance to the National legislation

3D-FISH and Immunodetection

Cells were immobilized on Cell-Tak (BD Biosciences)-coated glass coverslips. The slides were then treated as described previously to preserve their 3D structure[14]. Denatured nuclei were hybridized overnight with denatured probes, either IGH/CCND1 for t(11;14) or IGH/MYC/CEP8 for t(8;14) (Abbott Molecular). After probe hybridization, slides were washed and nucleoli were detected using mouse anti-B23 antibody (Sigma) and chicken anti-mouse Alexa 647 (Molecular Probes). Confocal microscopy, image processing and statistical analysis were carried out as described in **Supplementary Methods**.

Nuclear extracts and EMSA

Nuclear extracts were prepared from HeLaS3 cells and EMSA assay was carried out as described in **Supplementary Methods**.

Plasmids

The pEGFPC1Nucleolin nucleolin expression plasmid expressing nucleolin[15] was a kind gift of Dr. J. Borowiec. The plasmids used for the luciferase activity were derived from the 1748D1Luc plasmid (a gift of Dr. B. Sola), renamed pD1Luc. The putative LR1 sites were synthesized *in vitro* and cloned into the BamH1 restriction site of the 1748D1Luc:

LR1.1 5’-GATCCTGGCCTCTCCCAGGCTGGGCCACCTGCCAGG-3';

LR1.2 5’-GATCCATCTCTCCCCAGCCTTGACCCCAATAAGG-3';

LR1.3 5’-GATCCGAGCCATGGGTCCAGCCTGACCCGCATG-3'.

Reporter gene assays

Luciferase activity was determined 48h after transfection with luciferase reporter plasmid using the Dual Luciferase Assay (Promega) and normalized to protein concentration and to the activity

of the phRL-TK reporter (Promega). All transfections were performed in triplicates and repeated in three independent experiments. Figures show the average result of three independent experiments.

Reverse transcription and qPCR

Total RNA was isolated from $2x10^6$ Hela cells transfected with the pEGFPC1Nucleolin expression plasmid[15] and from mock-transfected HeLa cells using Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, AB). cDNA was amplified using specific primers and the Taqman PCR mix (AB). Expression was analyzed using the ΔΔCt method. The primers used for amplification are listed in **Supplementary Methods.**

Chromatin inmmunoprecipitation

ChIP was performed starting from GRANTA-519 cells and normal human lymphocytes using the ChIP-IT Express kit (Active Motif) and antibodies against CTCF (Abcam) nucleolin (Sigma), acetylated and methylated forms of H3 (Abcam) according to the manufacturer's protocol. Immunoprecipitated DNA was PCR-amplified using specific primers listed in **Supplementary Methods.**

ChIP-on-chip.

DNA samples were hybridized to a human genome tiling array consisting of 50-mers positioned along non-repeated sequences of the selected regions of chromosomes 8, 11, 14, 16 and X. Raw data were collected by Nimblegen (Roche-NimbleGen). The results were deposited in the GEO database. ChIP-on-chip analysis is described in **Supplementary Methods.**

RESULTS

The translocated *Ccnd1* allele relocalizes close to a nucleolus

In MCL cells, the balanced t(11;14)(q14q32) translocation moves one *Ccnd1* allele from its normal position on chromosome 11q to a position on the der14. We wondered whether this translocation was associated with a change in the nuclear positioning of the *Ccnd1* and *IgH* genes. To analyze their radial positioning, cells from the MCL-derived Granta-519 cell-line were analyzed by 3D-FISH using specific probes **(Figure 1A)**. For each signal, the minimal distance to the nuclear membrane was measured in the three-dimensional space of the nucleus. From the juxtaposed signals they produced, the *IgH* and *Ccnd1* loci on the der14 were readily and systematically identified in every cell. Results reported in **Figure 1B** (illustrated in **Figure S1A**) indicate that for each gene, the distribution of each of the two alleles differed according to whether *Ccnd1* and *IgH* lay on a non-rearranged chromosome or on the der14. Thus, for both genes, the percentage of alleles in the centermost radial position was significantly higher when on the der14 than on the intact 14 (*IgH*, 67% vs 46%) or 11 (*Ccnd1*, 70% vs 49%) ($p<0.001$). Similar results were obtained in UPN1 and Jeko, two other MCL cell lines tested, as well as in fresh lymphoma cells from MCL patients (data not shown). Having observed this relocalization, we next asked whether the juxtaposed *IgH* and *Ccnd1* alleles had been displaced towards a specific subnuclear domain. Indeed, the der14 *IgH* and *Ccnd1* signals appeared to concentrate in the periphery of nucleoli, as previously noticed[16]. To quantify this observation, distances to the closest nucleolus were measured for both alleles of the *IgH* and *Ccnd1* genes. The distributions differed strikingly between normal and rearranged alleles **(Figure 2 and Figure S1B)**. Thus, the der14 *IgH* and *Ccnd1* signals were located less than 1µm away from a nucleolus in greater than 72 % of the nuclei versus only ~37% for their counterparts on intact chromosomes 11 14 (**Figure 2**; $p<0.001$). Likewise, in lymphoma cells from three patients with MCL **(Figure 3)** as well as in

the UPN1 and Jeko cell lines (not shown), the der14 *Ccnd1* gene allele was found to lie much more frequently less than 1 µm away from a nucleolus (58, 70 and 47% of the signals in each of the three patients) than the second allele on the non-rearranged chromosome (29, 33 and 24%, respectively; $p<0.001$).

The rearranged *IgH-Ccnd1*-carrying chromosomal fragment associates with perinucleolar transcription factories, not heterochromatin

Ccnd1 which is not expressed in normal naive B cells has been found expressed in a monoallelic fashion in cancer cells[16,17]. The *IgH-Ccnd1* chromosomal fragment on der14 chromosome being located close to a nucleolus, we wondered whether *Ccnd1* transcription would actually take place in perinucleolar territories which are not known for being prone to PolII-dependent gene transcription. To test this, Granta-519 cells were stained using the B23 antibody that decorates nucleoli and an antibody to the phosphorylated C-terminal domain of the transcriptionally-active form of PolII. Clusters of active PolII molecules were indeed detected readily in the immediate vicinity of nucleoli **(Figure 4A)**. This was compatible with gene transcription taking place in this particular nuclear territory. In each cell, the proximity between the *IgH-Ccnd1* chromosomal fragment and activated PolII foci was then evaluated. Signals from *IgH* (**Figure 4B-i**, green), *Ccnd1* (**Figure 4B-ii**, red) and PolII (**Figure 4B-iii**, white) often coincided in a location immediately adjacent to a nucleolus (**Figure 4B-iv**, blue). This can be clearly seen in the overlays superimposing the *IgH*, *Ccnd1* and nucleolus with (**Figure 4B-vi**) or without (**Figure 4B-v**) the PolII staining. In contrast, the *Ccnd1* signals generated from the intact chromosome 11 almost never colocalized with a PolII transcription factory (data not shown), consistent with the monoallelic expression of *Ccnd1*.

We then simultaneously visualized the *IgH* and *Ccnd1* genes, nucleoli and heterochromatin (H3K9me3). One example of such an analysis is displayed in **Figure 4C** with the four profiles generated along an axis shown in Figure **4C-i**. As expected, the *IgH* (green) and *Ccnd1* (red) peaks were almost superimposed, consistent with their juxtaposition on the der 14. The nucleolus fluorescence (blue) lay very close to the *IgH-Ccnd1* double peak. The heterochromatin fluorescence profile (grey) appeared as alternating peaks and ditches, with one ditch precisely corresponding to the *IgH-Ccnd1* double peak. Taken all together, these results confirmed the juxta-nucleolar localization of the *IgH -Ccnd1* chromosomal fragment and its association with PolII transcription factories interspersed between heterochromatin-rich areas.

CTCF binds upstream of the *Ccnd1* gene in MCL cells

Regardless of their subnuclear localization, gene loci can be protected from nearby activating elements by insulator sequences such as those bound by the CCCTC-binding factor CTCF (for review see[18]). Using the Transfac software[19], two potential CTCF-binding sites, referred to here as CTCF26 and CTCF2, were identified 26 and 2 kb upstream of the *Ccnd1* promoter **(Figure 5A)**. Their potential as CTCF-binding sites was tested in EMSA experiments. A strong retardation signal was produced in the presence of CTCF2 (**Figure 5B**, lanes 2, 3). The electrophoretic retardation of labeled CTCF2 was abolished in the presence of a 10x excess of FII, the canonical CTCF site (lanes 4,5), or with cold CTCF2 (lanes 8,9) but not CTCF26 (lanes 6,7). The presence of CTCF was confirmed by ChIP experiments on Granta-519 cell line and normal lymphocytes. In control lymphocytes, the CTCF-specific antibody precipitated the chromatin fragment containing CTCF2, but not those containing CTCF26 or the negative control sequences (Figure 5C). This sharply contrasted with the ChIP results in Granta-519 cells where a 21-fold enrichment was obtained with the CTCF2-containing chromatin fragment, as compared to less than 5-fold in normal lymphocytes. Thus, the CTCF-binding element located 2 kb

upstream of the transcription start site of *Ccnd1* is indeed occupied by CTCF in MCL cells and to a lesser extent in normal lymphocytes. This may play a role both in insulation of the *Ccnd1* promoter and in transcriptional regulation via CTCF.

Nucleolin binds the *Ccnd1* gene and activates its transcription

Since in MCL cells, the *Ccnd1* gene is transcribed despite CTCF being bound immediately upstream of its transcription start site, we reasoned that a nucleolus-derived factor interacting with potential enhancer elements located further downstream in the *Ccnd1* gene would be well suited to play a role in transcriptional activation. One of the most abundant components in nucleoli is nucleolin, a multifunctional protein implicated in transcription regulation and other nuclear processes. Together with HnRNP-D, nucleolin forms a site-specific DNA-binding heterodimer known as LR1 whose transactivating activity is crucial for normal B-cell development[20]. During B-cell differentiation, intragenic recombination and class switch require the binding of LR1 to specific nucleotide sequences in the switch region of the *IgH* locus[21]. We have detected three putative LR1-binding sites within or in the vicinity of the *Ccnd1* gene, one intronic in the body of the gene (LR1.1), the other two (LR1.2 and LR1.3) immediately downstream of the *Ccnd1* coding sequence **(Figure 5A)**. Each site was cloned into a luciferase-expressing reporter and tested in HeLa cells for its capacity to enhance basal transcription. Luciferase expression increased 1.9 to 5.6-fold in cells transfected with each of the three LR1 site-containing constructs, comparable with the 4.2-fold increase obtained using the positive control Eμ enhancer from the *IgH* gene (**Figure 5D)**. Thus the nucleolin/LR1 binding sequences present in the *Ccnd1* gene behave as *bona fide* transcriptional enhancers, consistent with the an activating role in *Ccnd1* transcription in MCL cells.

To further investigate this possibility, ChIP-on-chip experiments were performed on Granta-519 MCL cells and normal lymphocytes using an anti-nucleolin antibody. An MCL-specific interaction was observed, the presence of nucleolin being testified at several locations within and around the *Ccnd1* gene, including the above described LR1 sites (**Figure S2A-B**). A higher nucleolin content was additionally observed near the breakpoint region on chromosome 14 (**Figure S2C**), but not on a chromosome 8 region used as control (**Figure S2D**). The ChIP-on-chip experiments also revealed vast amounts of lysine 9-acetylated histone H3 at the *Ccnd1* promoter (**Figure S2A-B**), consistent with the high transcriptional activity of this gene. Together, these data are in agreement with the previously reported presence of active chromatin marks at the *Ccnd1* promoter region in MCL cells[4] and further indicate that the relocalisation of the *CCND1* locus favors its increased interaction with nucleolin.

A transactivating role for nucleolin in MCL and other non-Hodgkin B-cell lymphomas

Thus, in MCL cells, the translocated *Ccnd1* allele gets localized in a perinucleolar territory and becomes transcriptionally active, presumably under the influence of nucleolin. To further circumstantiate a transactivating role for this protein, HeLa cells were transfected with a GFP-nucleolin construct. GFP-positive cells were sorted and found to contain nucleolin spread throughout the nucleus (data not shown). In these transfectants, *Ccnd1* transcription levels were more than two-fold higher than those measured in mock-transfected cells, with actin B or rRNA 18S transcription remaining unchanged **(Figure 6A)**.

Whether the proximity with a nucleolus is important for *Ccnd1* transcription in MCL cells was further tested When Granta 519 MCL cells were submitted to Abexinostat (S78454 / PCI-24781), a pan-histone deacetylase inhibitor whose action provokes an overall disorganization of the nuclear structure. In cells thus treated, the percentage of the der14-carried *Ccnd1* alleles still

localized next to a nucleolus decreased from 75% to 53% as early as one hour after treatment **(Figure 6B)** and this was accompanied by a four-fold reduction in *Ccnd1* transcription **(Figure 6C)**, consistent with *Ccnd1* expression in MCL cells requiring an unperturbed chromatin and nuclear organization .

Bcl2 and *c-myc*, the two proto-oncogenes activated in follicular and Burkitt's lymphomas, respectively, were also found activated in nucleolin transfectants (**Figure 6A**). Confirming the previous report that the nucleolin-containing transcription factor LR1 is a transcriptional activator for *c-myc* [22], this further suggested that in these B-cell tumors with a t(14;18) or t(8;14) translocation, an important step in the transformation process could relate to the relocalization in the vicinity of a nucleolus of a fragment of the rearranged *IgH*-carrying chromosome. This hypothesis was tackled using the endemic BL-derived Raji cell-line which harbors the canonical t(8;14)(q24;q32) translocation. In this cell-line, one allele of the *c-myc* oncogene, normally on chromosome 8, gets localized immediately telomeric to an *IgH* switch region on the der14 following the translocation event. Our 3D-FISH results generated using specifically designed probes (**Figure 7A**) were very similar to those observed in MCL cells. Indeed, the *IgH* and *c-myc* alleles juxtaposed on the der14 were observed farther from the nuclear membrane than their counterparts on intact chromosomes 14 and 8 (34% vs. 51% and 35% vs. 54% centrally localized *IgH* and *c-myc* alleles, respectively, $p<0.01$, **Figure 7B**). Furthermore, the *IgH* and *c-myc* alleles on the rearranged chromosome 14 lay closer to a nucleolus than those on intact chromosomes 14 and 8 (**Figure 7C**, *IgH*, 66% vs. 38%, and *c-myc*, 67% vs. 49% of the alleles on the rearranged vs. non-rearranged chromosomes, respectively, $p<0.01$).

DISCUSSION

Experiments performed in the early and mid-nineteen eighties led to the idea that the translocation of a proto-oncogene next to a transcriptional activator would trigger molecular events crucial for cell transformation. Experiments with the *c-myc* proto-oncogene were particularly thought-provoking. Mice rendered transgenic with an unmodified *c-myc* placed immediately downstream of the *IgH* locus Eμ enhancer exhibited enlarged B-cell compartments resulting in the constant emergence of monoclonal B-cell proliferations[23]. At the time, the constructs had been designed upon the naturally-occurring rearrangements observed in mouse plasmacytomas. In those early transgenic experiments, the genetic elements introduced in murine recipients were separated by hundreds of nucleotides only, far different from the genomic organization observed in human translocation-bearing B-cell tumors where the distance between the *IgH* locus and the translocated proto-oncogene can be orders of magnitude larger. Such is indeed the case in the vast majority of follicular lymphomas with the t(14;18) translocation . Following the chromosomal rearrangement, one allele of the *Bcl2* anti-apoptotic gene is displaced from chromosome 18 to the der14 where it now lays hundreds of kilobases telomeric to the *IgH* locus. Using the chromosome conformation capture methodology, Duan et al. have evidenced a direct interaction between enhancers present in the 3' region of the *IgH* locus and the 5' promoter region of the newly transcribed translocated *Bcl2* allele[24]. This is in accordance with our improved understanding of chromatin loops and nuclear organization which allow regulatory elements positioned in *cis* at distances up to the megabase range to come in direct contact with each other in the three-dimensional space of the cell nucleus (for review see [25]).

Here, we have focused on MCL, a B-cell proliferation which has been less studied so far but whose chromosomal rearrangement also interests the *IgH* locus. Similar to *Bcl2* in follicular lymphoma, the translocated *Ccnd1* allele lies at a relatively large linear distance from

transcriptional enhancers in the *IgH* locus. Also similarly, the translocation results in the expression of a gene which is silent in normal naive B cells and whose expression appears directly related to the transformation process. Importantly, MCL differs from the BL model as transgenic mice expressing the *Ccnd1* gene under the control of the *IgH* Eμ enhancer do not develop lymphomas [26]. To better understand the underlying mechanisms induced by the t(11;14) translocation, we have explored the nuclear positioning of each allele of the *Ccnd1* gene in MCL cells. In both cell-lines and fresh tumor cells, the translocated *Ccnd1* allele was observed farther from the nuclear membrane than the allele on the intact chromosome 11 and also farther than the usual *Ccnd1* radial position in naive B cells (data not shown). This translocation-associated displacement away from the nuclear membrane resulted in a new positioning in the vicinity of a nucleolus, a difference which was statistically significant between the *Ccnd1* alleles on the rearranged vs intact chromosomes. In MCL cells, *Ccnd1* is known to be expressed monoallelically[17], a situation also reported for other somatic genes[27]. Our data are totally consistent with transcription taking place solely from the translocated *Ccnd1* allele.

Using immuno-FISH experiments, the *IgH* and *Ccnd1* loci present on the der14 were revealed as juxtaposed signals. In most instances, those were located in the immediate vicinity of clusters of transcriptionally active PolII molecules, in sharp contrast with the untranslocated *Ccnd1* alleles whose vast majority lay away from transcription factories. The presence of active PolII clusters in the periphery of nucleoli which in normal cells is mostly occupied by heterochromatin and therefore not prone to PolII transcription should not come as a surprise since active chromatin marks have been reported previously in the *Ccnd1* promoter region of MCL cells[4].

What triggers *Ccnd1* transcription from the derivative chromosome 14? To answer this question, we hypothesized that a nucleolus-derived factor could contribute to this transcriptional activation. LR1 is a DNA-binding heterodimer composed of HnRNP-D and nucleolin, a major

component in nucleoli and a potent transcriptional activator. Binding sites for LR1 were identified within the *Ccnd1* gene and indeed shown to function as transcriptional enhancers. In ChIP experiments, nucleolin was directly detected *in vivo* within and around the *Ccnd1* gene. Furthermore, *Ccnd1* transcription got also activated in transfected HeLa cells overexpressing nucleolin. Conversely, when the overall organization of MCL Granta 519 cells was perturbed following treatment with an inhibitor of histone deacetylases, the percentage of *Ccnd1* alleles associated with a nucleolus decreased rapidly in parallel with levels of *Ccnd1* transcription. Together, these results strongly suggest that *Ccnd1* transcription gets activated in MCL cells because the translocated *Ccnd1* allele gets localized in the nucleolin-abundant environment found in perinucleolar areas. In this regard, it is tempting to speculate that nucleolin and possibly other nucleolar components such as nucleophosmin or ribosomal proteins could also participate in PolII transcription in malignant cells.

The literature contains one report of inhibition of nucleolin expression in HeLa cells and fibroblasts treated for five days with a combination of siRNA. This inhibition was accompanied by many abnormalities, including a lowered proliferation index, an accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle and eventual entry of the cells into apoptosis[28]. In addition to its ribosomal-related functions, nucleolin has also been characterized as a histone chaperone and chromatin co-remodeler. In view of its variable cellular localization and pleiotropic functions and because of the well-known difficulties for efficiently transfecting B lymphocytes, we have not attempted here to extinguish nucleolin expression in MCL cells.

The results we have obtained are partially contradictory to those reported by the Epner's group who has found no difference in positioning between the translocated and untranslocated *Ccnd1* alleles[16]. Possible reasons for this discrepancy include our methodology to measure radial positioning and distances to a nucleolus. Here, we have carefully distinguished between the

translocated and non-translocated alleles, the latter being almost never observed in the proximity of a nucleolus. Also, the 3D-FISH methodology we have applied to MCL cell lines and B-lymphocytes from MCL patients may have allowed more precise measurements than in the two-dimensional FISH experiments performed by Liu et al.[16].

To account for *Ccnd1* expression in MCL cells, we propose a model whereby the key event occurs when one *Ccnd1* allele gets newly localized to a transcriptionally favorable perinucleolar territory in these cancer cells. Can a similar mechanism apply in other hematopoietic malignancies with chromosomal rearrangements interesting acrocentric chromosomes? In the major reciprocal t(8;14) translocation associated with Burkitt lymphomas, the chromosome 8-carried proto-oncogene *c-myc* gets localized head to head next to the *IgH* locus on the rearranged acrocentric 14. Differing from sporadic forms of BL where the 5' end of *c-myc* is decapitated following the chromosomal break, in the endemic form, an intact *c-myc* gene gets juxtaposed to the *IgH* locus along with hundreds of kilobases of genomic sequence from the 5' region of *c-myc*. In this new setting, *c-myc* is localized at a long distance from the *IgH* locus, reminiscent of the situation in FL and MCL. In Raji, a prototypical endemic BL cell-line with *c-myc* hundreds of kilobases telomeric to the *IgH* locus, our experiments have revealed that the rearranged chromosome 14 fragment which now carries *IgH* and *c*-myc gets repositioned close to a nucleolus. In this new setting, *c-myc* may fall in the action range of nucleolar factors such as nucleolin which in our transcription assays was found to activate *c-myc* even better than *Ccnd1*. Further experiments will be necessary to explore the actual relevance of such a mechanism in various B-cell proliferations and to investigate the respective role of nucleolar components and *cis* regulation in the activation of genes crucial for transformation in MCL, BL and other non-Hodgkin B cell lymphomas.

Acknowledgements

We thank Dr. J. Borwiec and B. Sola for the gift of plasmids. This research was supported by grants from the Fondation de France and INCa to YV, from Presidium of the Russian Academy of Sciences (MCB grant) to SR and by RFBR foundation 13-04-93105 and 12-04-93109 to OI. AP was supported by a post-doctoral fellowship from the Fondation de France.

Author Contribution

JA, AP, OI ,MK, EZZ, DM, NP, IO performed research. AB, JW, ML, VR, OI, SR, ML, YV analyzed data. VCC, VR contributed reagents. ML, YV wrote the paper

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Repositioning of *IgH* and *Ccnd1* in MCL cells. FISH was performed on three-dimensionally-preserved Granta-519 cell nuclei to reveal the *IgH* and *Ccnd1* alleles.

A, Schematic representation of the chromosomes involved in the t(11;14) translocation in MCL cells and localization of the *IgH* and *Ccnd1* probes utilized.

B, Distribution of the translocated (der14) and non-translocated *IgH* and *Ccnd1* alleles according to their radial positioning in GRANTA-519 cell nuclei. Distances were measured as described in Materials and methods. Histograms represent the percentage of FISH signals in the nuclear space with the range 0.0 -0.15 corresponding to the centermost fraction of the nucleus and 0.75-1 to its periphery. Each graph represents a minimum of 120 FISH signals.

Figure 2. Perinucleolar relocalization of the der14 *IgH* and *Ccnd1* alleles in the MCL GRANTA-519 cell-line. The *IgH* and *Ccnd1* alleles and nucleoli were revealed by immuno-FISH. Distances to the closest nucleolus were measured as described in Materials and methods for a minimum of 120 FISH signals.

Figure 3. Perinucleolar relocalization of the translocated *Ccnd1* allele in MCL patients. Immuno-FISH and distance measurements were performed as in Figure 2 specifically on cells with the t(11;14) translocation which were detected by colocalization of the IgH and Ccnd1 signals in the nuclei. Graphs show the distance (μm) of FISH signals to the nucleoli. Each graph corresponds to one patient with MCL. Distances have been measured in at least 100 nuclei. ***: $p<0.001$.

Figure 4. Simultaneous detection of fluorescently-labelled transcription factories, nucleoli, heterochromatin, *IgH* and *Ccnd1* alleles in the Granta-519 MCL cell-line.

A (**i)** Active RNA polymerase II (green) and nucleoli (B23, blue) were immunostained with the nucleus counterstained with DAPI (grey); (**ii)** enlargement focused on the nucleolus. Scale bar: 5μm.

B *IgH* (green, **i**), C*cnd1* (red, **ii**), active RNA polymerase II (grey, **iii**) and nucleoli (B23, blue, **iv**) were simultaneously revealed by immuno-FISH. In merged images shown in (**v**) (merged from **i**, **ii** and **iv**) and (**vi**) (merged from **i**, **ii**, **iii** and **iv**), the arrow points to the der14-carried *IgH* and *Ccnd1* alleles. Scale bar: 5 μm.

C Immuno-FISH was performed for *IgH* (green), *Ccnd1* (red), nucleoli (B23, blue) and heterochromatin (H3K9me3, grey). Individual profiles of fluorescence intensity shown in (**ii**) were determined for each signal on a single confocal section following the axis shown in (**i**). Scale bar: 5 μm.

Figure 5. CTCF- and LR1-binding sites in the *Ccnd1* gene.

A Schematic representation of putative CTCF- and LR1-binding sites within and around the *Ccnd1* gene.

B Gel retardation assay using a labelled oligonucleotide corresponding to the CTCF2 sequence.

NPE, Nuclear protein extract prepared from HeLa cell nuclei; dI/dC, unlabelled non-specific competitor; FII, canonical CTCF site [29], CTCF2 and CTCF26 indicate unlabelled oligonucleotides tested for their capacity to compete for labelled CTCF2. The arrow points to the position of the CTCF2-specific band.

C CTCF binding *in vivo*. ChIP was performed on Granta-519 cells and normal lymphocytes using anti-CTCF dark and light grey bars, CTCF Ab) or a non-specific antibody (black bars, ctrl IgG). The precipitated DNA fragments were analyzed by qPCR using primers for amplification of sequences located approximately 70 kb centromeric to the *Ccnd1* gene or within its exon 4, neither being recognized by CTCF (immunoprecipitation negative controls, “ctrl” and ”Ex4"); for CTCF26 and CTCF2, the two potential CTCF binding sites identified in *Ccnd1*. Error bars represent the standard deviation between duplicates within the same experiment.

D LR1-binding sites in the *Ccnd1* gene as transcriptional enhancers. The transcriptional activity of the three potential LR1-binding sites identified in the *Ccnd1* gene was tested in HeLa cells 48 hrs after transfection. The enhancer strength was quantified relative to the luciferase activity generated with the reference SV40 promoter.

Figure 6. Co-localization of nucleoli and *Ccnd1,* and *Ccnd1* transcription levels.

A, A nucleolin-GFP pEGFPC1Nucelolin construct was transfected into HeLa cells followed by selection of GFP-positive cells by flow cytofluorimetry. Transcription of nucleolin, *Ccnd1*, *c-myc*, *Bcl2*, Actin B and 18S rRNA studied by qRT-PCR in GFP-nucleolin and mock-transfected cells. Error bars represent the standard deviation between duplicates.

B-C, *Ccnd1* localization and expression in GRANTA-519 cells treated with a histone deacetylase inhibitor. The localization of a *Ccnd1* allele less than 1μm from a nucleolus (**B**) as determined using 3D-FISH and *Ccnd1* transcription rate (**C**) as measured by qRT-PCR. The data represent the average results from two independent experiments.

Figure 7. Radial localization and distances to closest nucleolus for *IgH* and *c-myc* loci in the Raji BL cell-line.

A, Schematic representation of the chromosomes involved in the t(8;14) translocation in the Raji BL cell-line and localization of the *IgH* and *c-myc* probes utilized.

B, Distribution of the translocated (*IgH* – *c-myc* der14) and non-translocated (*IgH* 14 and *c-myc* 8) *IgH* and *c-myc* alleles according to their radial positioning in Raji cell nuclei. Distances were measured as described in Materials and methods. Histograms represent the percentage of FISH signals in the nuclear space with the range 0.0 - 0.15 corresponding to the centermost fraction of the nucleus and 0.75 - 1 to its periphery. Each graph represents a minimum of 115 FISH signals.

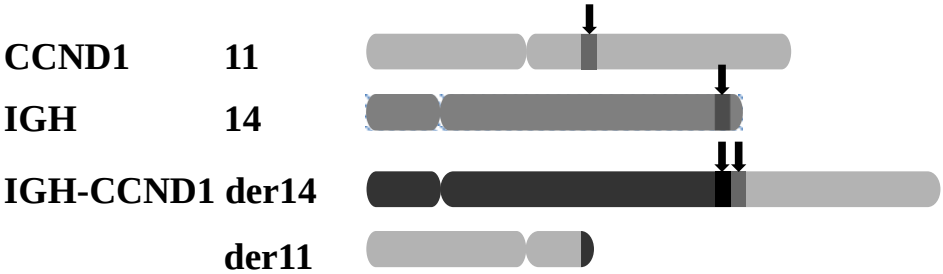
C, Perinucleolar relocalization of the der14 *IgH* and *c-myc* alleles in the BL Raji cell-line. The *IgH* and *c-myc* alleles and nucleoli were revealed by immuno-FISH. Distances to the closest nucleolus were measured as described in Materials and methods for a minimum of 115 FISH signals.

REFERNCES

1. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-262.
2. Klein IA, Resch W, Jankovic M, et al. Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell*. 2011;147(1):95-106.
3. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3416-3423.
4. Liu H, Wang J, Epner EM. Cyclin D1 activation in B-cell malignancy: association with changes in histone acetylation, DNA methylation, and RNA polymerase II binding to both promoter and distal sequences. *Blood*. 2004;104(8):2505-2513.
5. Degan M, Doliana R, Gloghini A, et al. A novel bcl-1/JH breakpoint from a patient affected by mantle cell lymphoma extends the major translocation cluster. *J Pathol*. 2002;197(2):256-263.
6. Greisman HA, Lu Z, Tsai AG, Greiner TC, Yi HS, Lieber MR. IgH partner breakpoint sequences provide evidence that AID initiates t(11;14) and t(8;14) chromosomal breaks in mantle cell and Burkitt lymphomas. *Blood*. 2012;120(14):2864-2867.
7. Cremer M, von Hase J, Volm T, et al. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*. 2001;9(7):541-567.
8. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Muller S, Solovei I, Fakan S. Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(3):307-316.
9. Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, et al. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*. 2009;137(2):356-368.
10. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*. 1999;145(6):1119-1131.
11. Kupper K, Kolbl A, Biener D, et al. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma*. 2007;116(3):285-306.
12. Mahy NL, Perry PE, Gilchrist S, Baldock RA, Bickmore WA. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol*. 2002;157(4):579-589.
13. Petrov AV, Allinne J, Pirozhkova IV, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking activity in vivo: implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy. *Genome Res*. 2008;18(1):39-45.
14. Solovei I, Walter J, Cremer M, Habermann FA, Schermelleh L, Cremer T. FISH: A Practical Approach. In: Squire J, Beatty B, Mai S, eds. FISH: A Practical Approach. Oxford: Oxford Univ. Press; 2002.
15. Kim K, Dimitrova DD, Carta KM, Saxena A, Daras M, Borowiec JA. Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(6):2463-2474.
16. Liu H, Huang J, Wang J, et al. Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *J Exp Med*. 2008;205(8):1843-1858.
17. Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;22(1):66-71.
18. Wallace JA, Felsenfeld G. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(5):400-407.
19. Wingender E, Dietze P, Karas H, Knuppel R. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(1):238-241.

20. Hanakahi LA, Dempsey LA, Li MJ, Maizels N. Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3605-3610.
21. Hanakahi LA, Maizels N. Transcriptional activation by LR1 at the Emu enhancer and switch region sites. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(14):2651-2657.
22. Brys A, Maizels N. LR1 regulates c-myc transcription in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(11):4915-4919.
23. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985;318(6046):533-538.
24. Duan H, Xiang H, Ma L, Boxer LM. Functional long-range interactions of the IgH 3' enhancers with the bcl-2 promoter region in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*. 2008;27(53):6720-6728.
25. Hou C, Corces VG. Throwing transcription for a loop: expression of the genome in the 3D nucleus. *Chromosoma*. 2012;121(2):107-116.
26. Fiancette R, Amin R, Truffinet V, et al. A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies. *Leuk Res*. 2010;34(8):1043-1051.
27. Takizawa T, Gudla PR, Guo L, Lockett S, Misteli T. Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev*. 2008;22(4):489-498.
28. Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, et al. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol*. 2007;8:66.
29. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 1999;98(3):387-396.

A


CCND1 11
IGH 14
IGH-CCND1 der14
der11

B

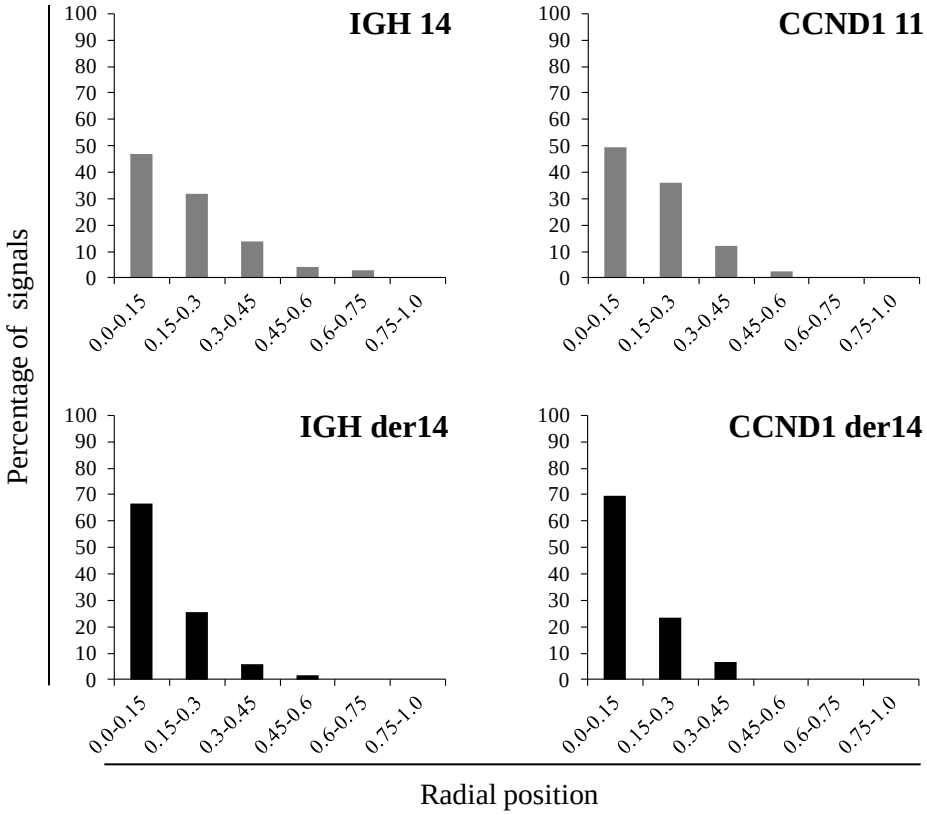

IGH 14
CCND1 11
IGH der14
CCND1 der14
Percentage of signals
Radial position
0.0-0.15
0.15-0.3
0.3-0.45
0.45-0.6
0.6-0.75
0.75-1.0

Figure 1

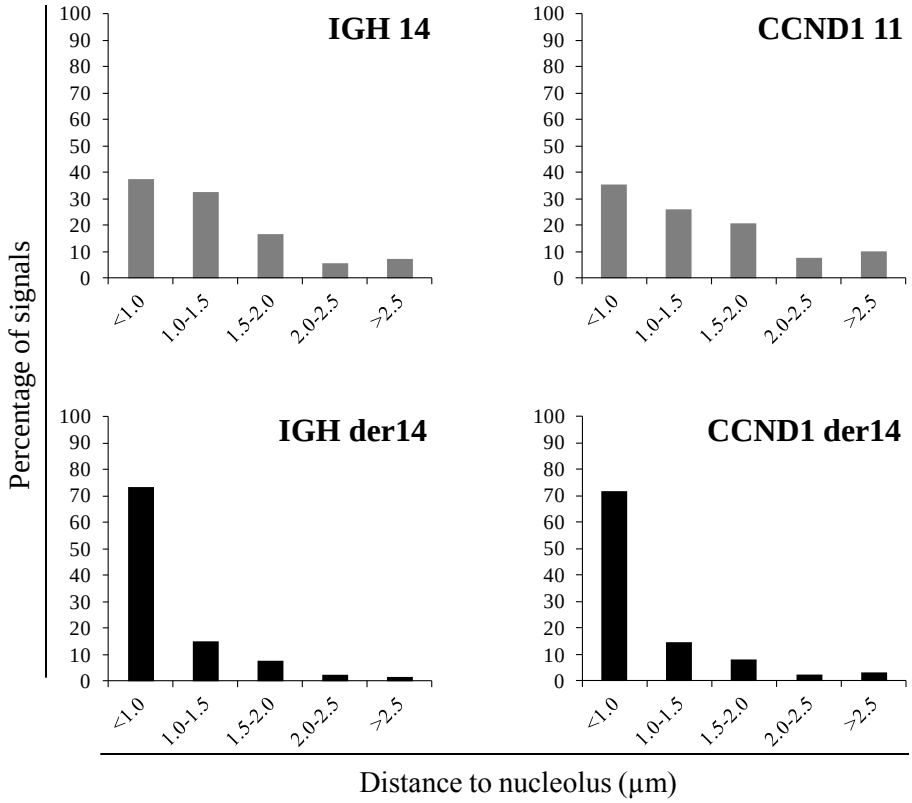
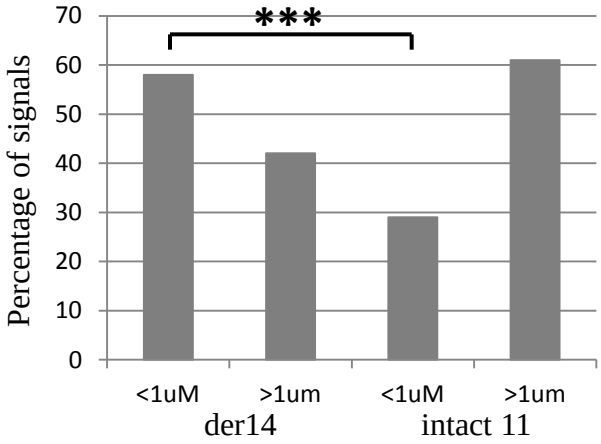
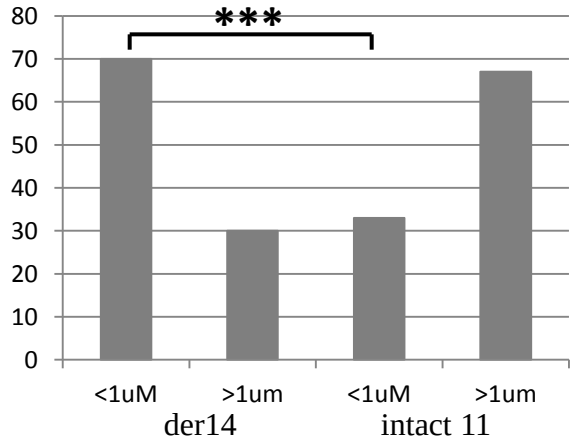

IGH 14
CCND1 11
IGH der14
CCND1 der14
Percentage of signals
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
<1.0
1.0-1.5
1.5-2.0
2.0-2.5
>2.5
Distance to nucleolus (μm)

Figure 2


Percentage of signals
70
60
50
40
30
20
10
0
***
<1uM
>1um
<1uM
>1um
der14
intact 11


80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
<1uM
>1um
<1uM
>1um
der14
intact 11

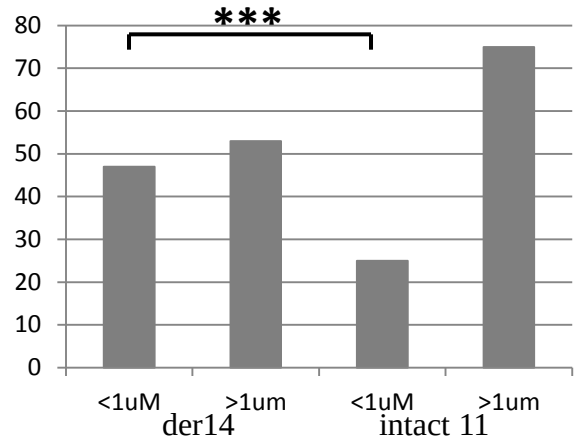

80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
<1uM
>1um
<1uM
>1um
der14
intact 11

Figure 3

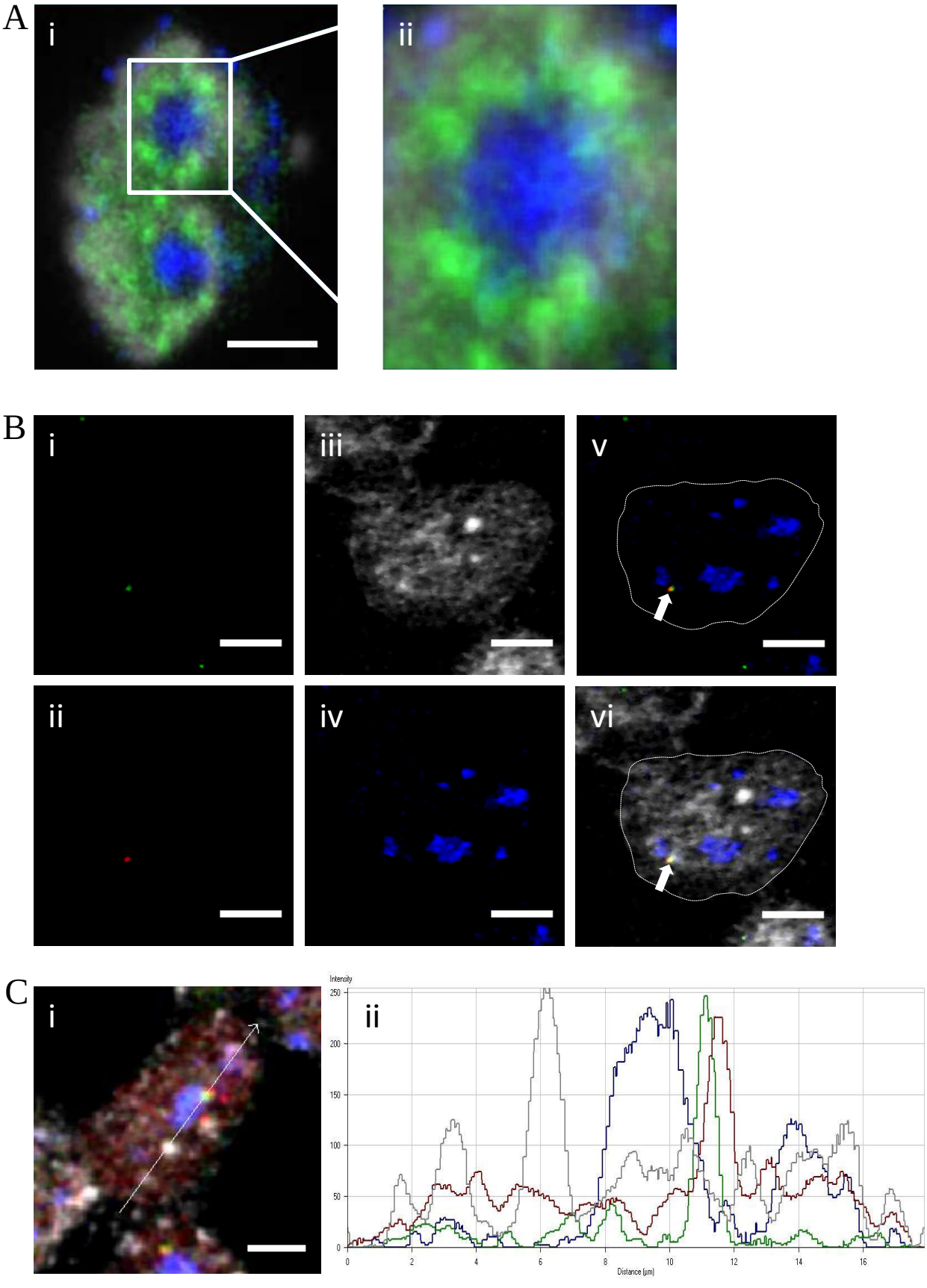
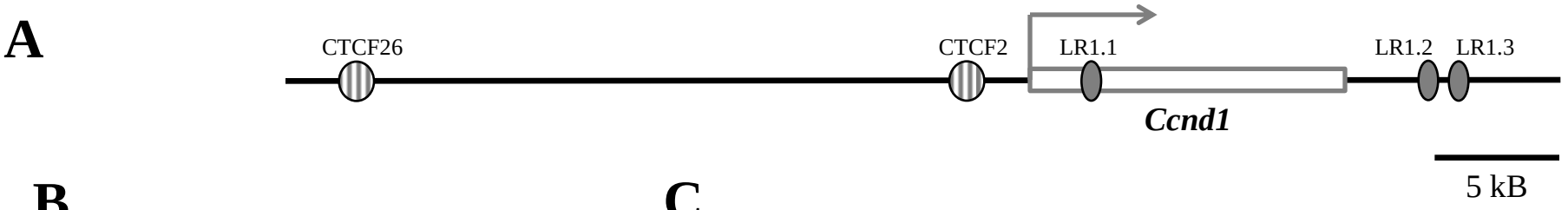
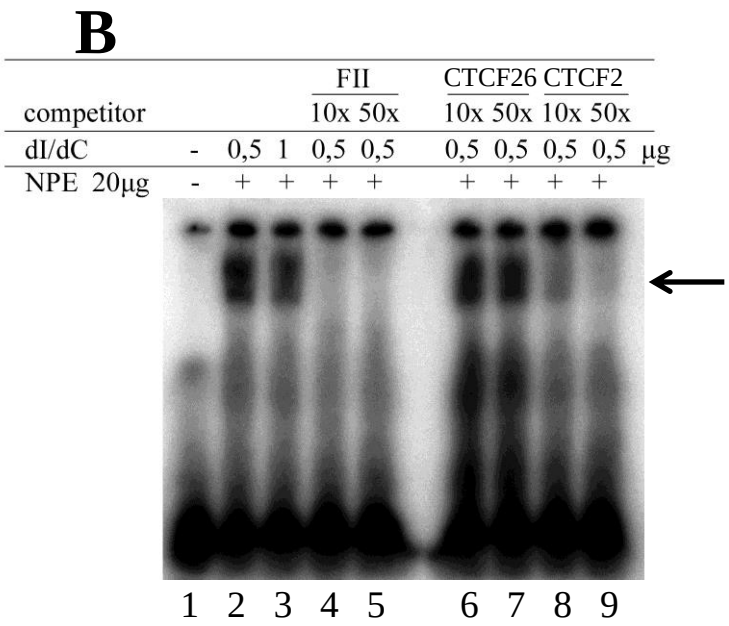
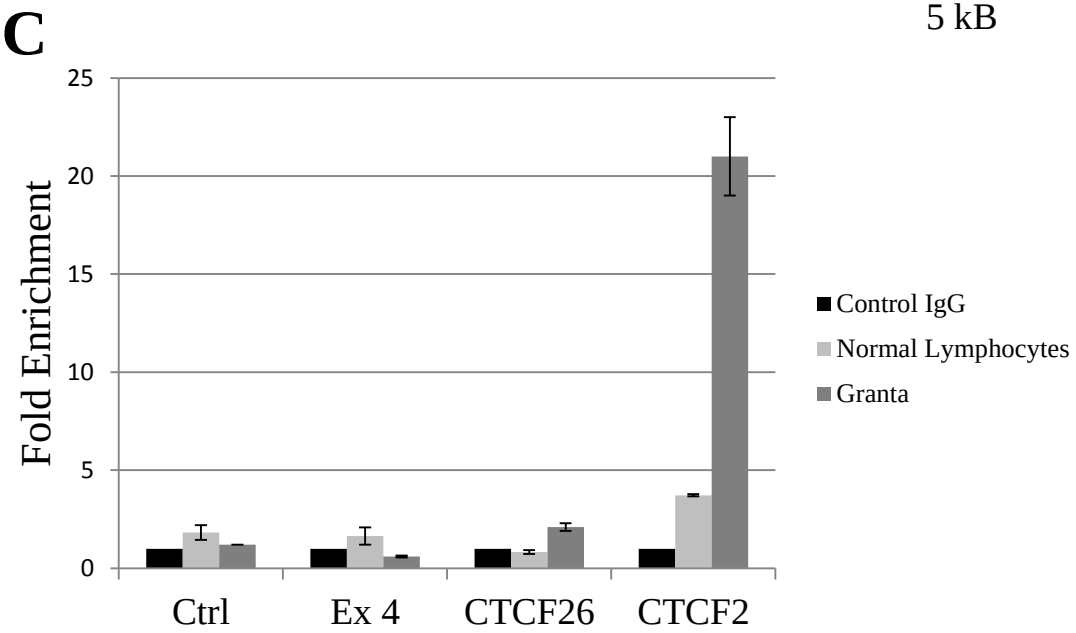

A
i
ii
B
i
iii
v
ii
iv
vi
C
i
ii
Intensity
250
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Distance (µm)

Figure 4


A
CTCF26
CTCF2
LR1.1
LR1.2
LR1.3
Ccnd1
5 kB


B
FII
CTCF26
CTCF2
competitor
10x 50x
10x 50x
10x 50x
dI/dC - 0,5 1 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 µg
NPE 20µg - + + + + + + + +
1 2 3 4 5 6 7 8 9


C
Fold Enrichment
25
20
15
10
5
0
Ctrl
Ex 4
CTCF26
CTCF2
Control IgG
Normal Lymphocytes
Granta

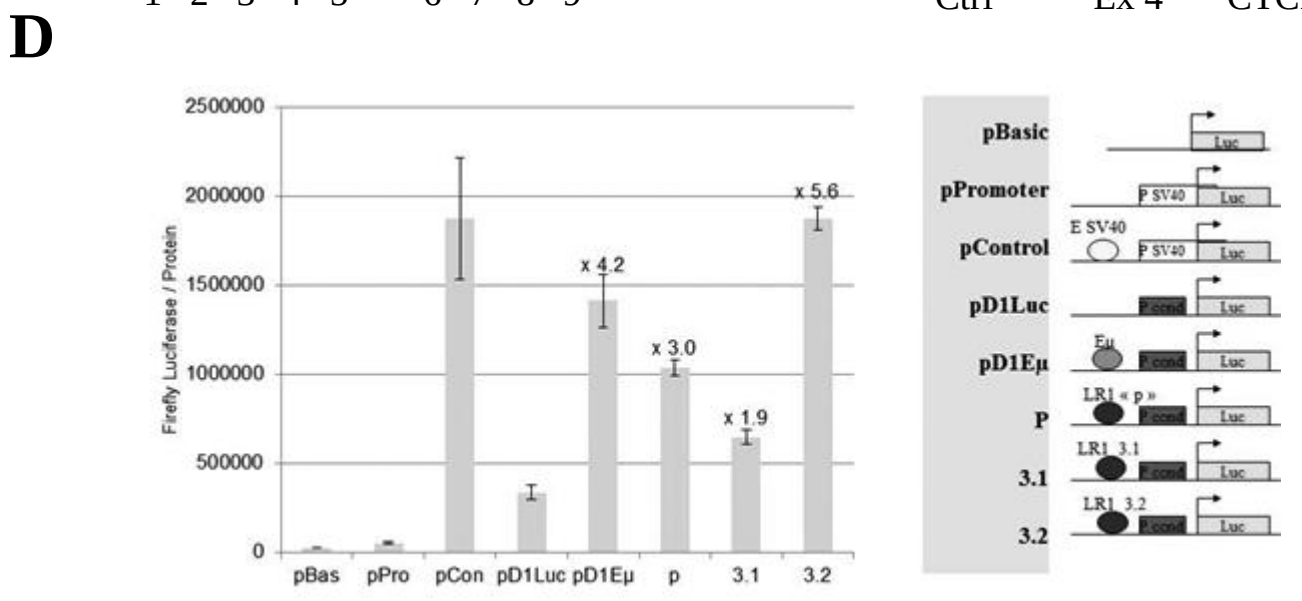
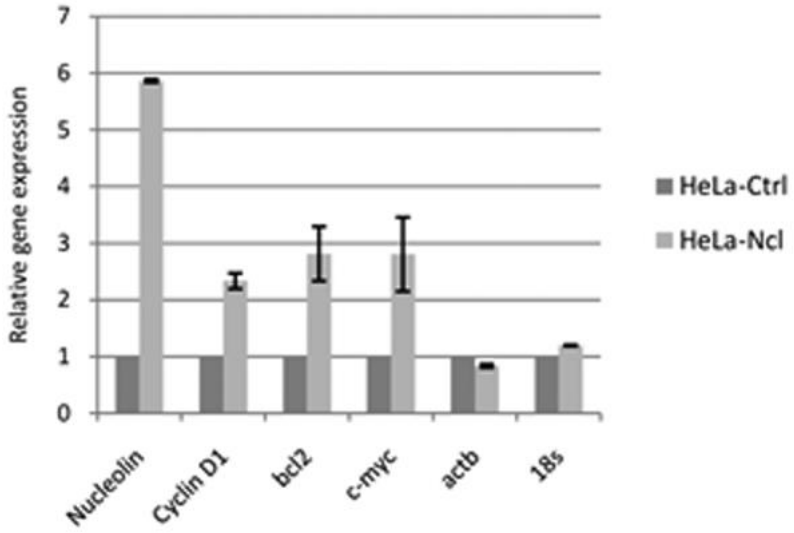
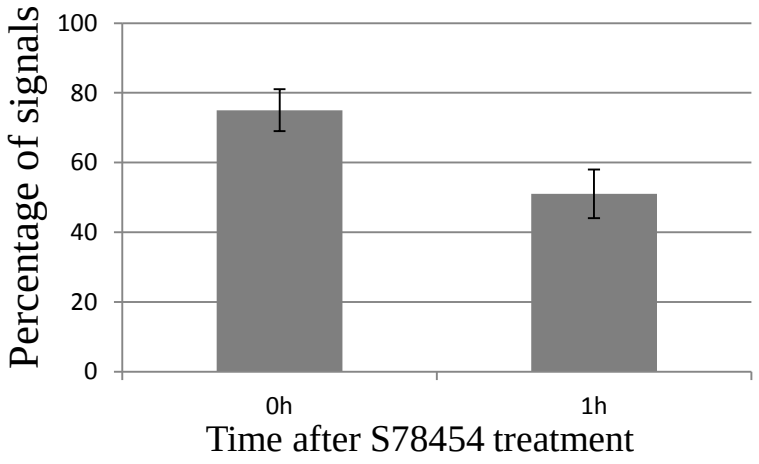

D
Firefly Luciferase / Protein
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
x 4.2
x 3.0
x 1.9
x 5.6
pBas
pPro
pCon
pD1Luc
pD1Eµ
p
3.1
3.2
pBasic
pPromoter
pControl
pD1Luc
pD1Eµ
P
3.1
3.2
Luc
P SV40
E SV40
Eµ
LR1 « p »
LR1 3.1
LR1 3.2

Figure 5

A


Relative gene expression
7
6
5
4
3
2
1
0
HeLa-Ctrl
HeLa-Ncl
Nucleolin
Cyclin D1
bcl2
c-myc
actb
18s

B


Percentage of signals
100
80
60
40
20
0
0h
1h
Time after S78454 treatment

C

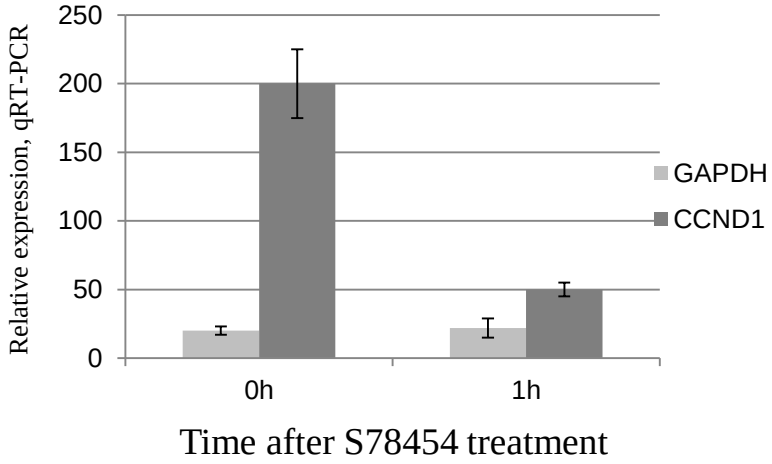

Relative expression, qRT-PCR
250
200
150
100
50
0
GAPDH
CCND1
0h
1h
Time after S78454 treatment

Figure 6

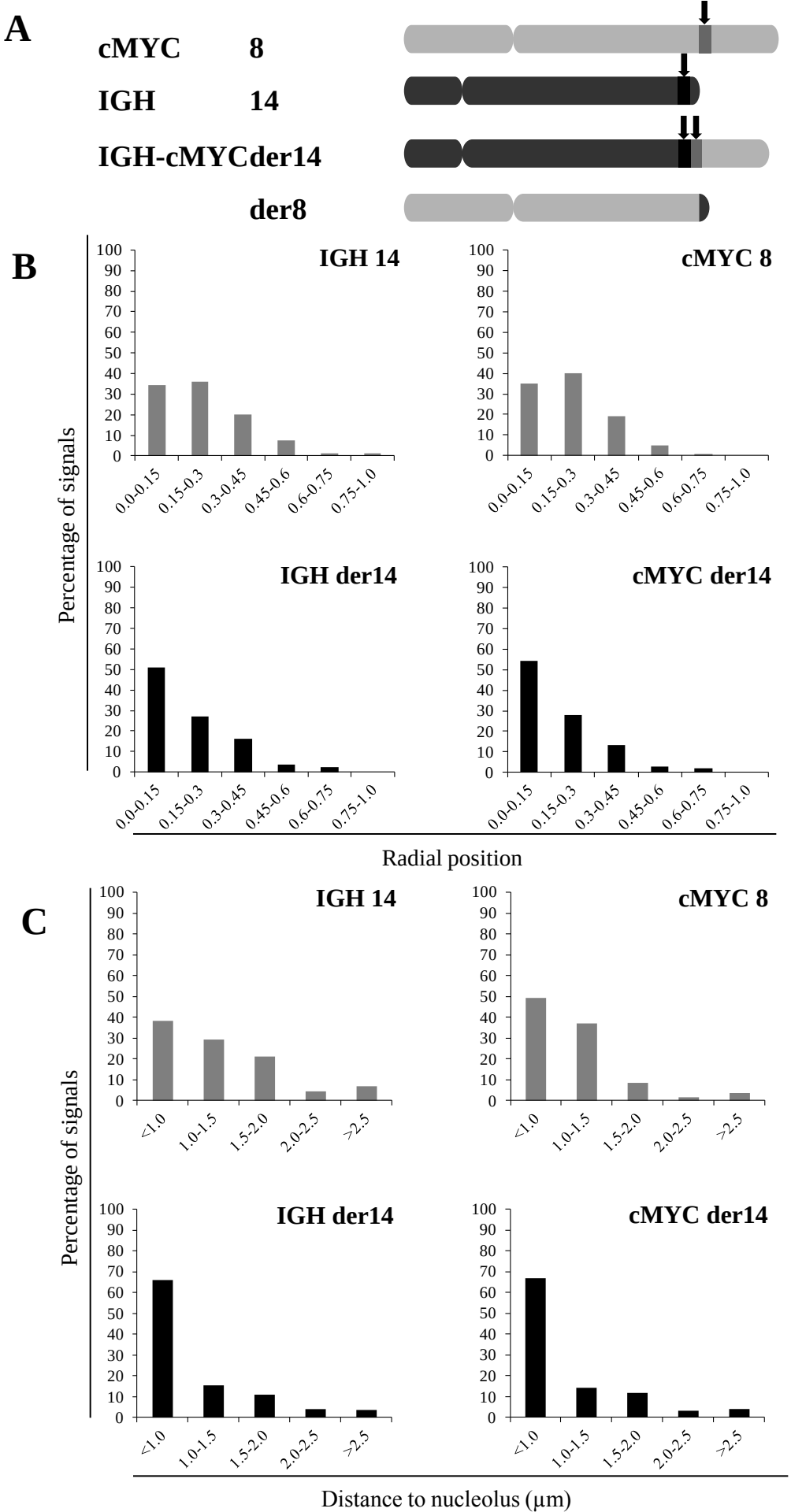

A
cMYC 8
IGH 14
IGH-cMYC der14
der8
B
IGH 14
cMYC 8
IGH der14
cMYC der14
Percentage of signals
0.0-0.15
0.15-0.3
0.3-0.45
0.45-0.6
0.6-0.75
0.75-1.0
Radial position
C
IGH 14
cMYC 8
IGH der14
cMYC der14
Percentage of signals
<1.0
1.0-1.5
1.5-2.0
2.0-2.5
>2.5
Distance to nucleolus (µm)

Figure 7

ISSN 0233–7657. Biopolymers and Cell. 2012. Vol. 28. N 4. P. 285–287

UDC 577.213 + 616-006.44

HIV: implication in Burkitt lymphoma

T. M. Tsfasman[1, 2], M. Klibi[1], A. M. Pichugin[1], M. Lipinski[1], Y. S. Vassetzky[1]

[1]Institut Gustave Roussy
114, rue Edouard Vaillant, Villejuif, France, 94805

[2]Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences
5a, Maliy Kazenniy lane, Moscow, Russian Federation, 105064

tanya.tsfasman@gmail.com

The risk of Burkitt lymphoma (BL) is increased in HIV-infected patients as compared to general population in Europe and in the US. This effect might be due to immune suppression and low CD4-cell counts associated with the development of AIDS. However, there is also evidence of a direct effect of HIV on B cell proliferation and differentiation, which may account for the development of B cell malignancies. We shall discuss possible mechanisms of implication of HIV in BL with a focus on the role of different viral components (Tat, Nef and gp120 proteins, viral envelope) in the c-myc/IgH translocation characteristic of BL.

Keywords: Burkitt lymphoma, lymphomagenesis, HIV-1.

Introduction. Burkitt lymphoma (BL) in African children is known to be associated with EBV infection. However, this is not always the case with the sporadic cases of BL in adults in other geographical areas [1, 2]. The incidence of sporadic BL is significantly increased in HIV-positive patients [3]. One of the EBV-encoded RNAs (EBER) characteristic of the latent viral cycle could be found only in about 30 % of HIV-related lymphoma cases [2]. Therefore, lymphomagenesis may be caused in these 30 % of cases by reactivation of EBV upon HIV infection, although these data are contested (compare [4], and [5]). At the same time, at least 70 % of cases of HIV-positive BL do not have a direct link to EBV infection.

The relative risk of various NHLs (Non-Hodgkin's lymphomas, to which BL pertain) in HIV-patients is clearly associated with immunodeficiency. Most of the lymphomas develop after the development of AIDS and the risk increases with the increase in viral loads and decrease in CD4-cell counts [6–8]. However, one cannot exclude the role of HIV itself in lymphomagenesis. In this review we are going to discuss mechanisms of HIV-associated BL, and various viral components that could be implicated in oncogenesis.

© Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2012

Molecular mechanisms of lymphomagenesis. The specific genomic trait of BL cells is a translocation of *c-myc* gene to imunnoglobulin gene loci, accompanied with *c-myc* oncogene overexpression [1, 9, 10]. In 80 % of BL cases B lymphocytes exhibit a translocation between the *c-myc* and *IgH* (immunoglobulin heavy chain) genes on chromosomes 8 and 14, respectively. Other variants include translocation between *c-myc* and other immunoglobulin gene loci on chromosomes 2 or 22 (*IgK* and *IgL* genes, respectively) [10]. The translocation is caused by errors in DNA repair via Non-Homologous End Joining (NHEJ). This mechanism joins two ends of broken DNA located in the immediate proximity [10–12]. The translocation partners therefore should be located closely together so that translocation could occur.

In normal naïve B-lymphocytes, *IgH* and *c-myc* loci are colocalized only in 6 % of the nuclei in mouse and humans ([12], Klibi et al., unpublished results). However, 5 min after induction of B cell proliferation with IL-4 admixed with antibodies to IgM and CD40, *c-myc* rapidly relocates from the border of the nucleus to transcription factories, including those with actively expres-

sed *IgH* gene. This causes an about 3-fold increase in *IgH*/*c-myc* colocalization rates [12]. The increased *IgH*/*c-myc* colocalization may consequently increase the translocation rate.

HIV and B cell abnormalities All the viral components that may contribute to B cell activation and the subsequent colocalization of *c-myc* and *IgH* loci might play a role in HIV-associated lymphomagenesis.

HIV infection leads to multiple B cell abnormalities, including hyperactivation, immunoglobulin class switching and HIV-specific B lymphocyte maturation [13–15]. Moreover, there are data on the relation of increased risk of lymphomagenesis with B cell activation upon viral infection [16]. It should be noted that there are other data that argue against such correlation [6].

HIV virions, Tat, and Nef, and possible lymphomagenesis. HIV infects primarily macrophages and T lymphocytes, although infection of some B cell subpopulations is also possible at a very low rate [17]. However, the virus may attach to B cell surface [18, 19]. It is likely that such binding may somehow alter B cell function. For instance, it has been shown that HIV-1 envelope protein Gp-120 decreases human B cell chemotaxis and CD62 ligand expression, and increases CD95-mediated B cell apoptosis in B cells isolated from human tonsils [20].

Another crucial viral component that can greatly influence B cells is the HIV-Tat protein, a small hydrophobic protein that is excreted by virus-infected cells and can penetrate through the membrane of other cell types [21]. Treatment of peripheral blood mononuclear cells with recombinant Tat protein at 12–24 nM (0.15–0.28 mg/ml) up-regulated Fas expression in B cells, which is a sign of B cell activation [22]. Conversely, addition of extracellular Tat at 0.5–1 mg/ml decreased the proliferation of tonsillar B cells stimulated with anti-IgM antibody and IL-4 or anti-IgM and CD40 antibodies [23]. Thus, Tat could be a potent modulator of B cell proliferation, which may lead to B cell malignancies. Consistent with this hypothesis, transgenic mouse lines expressing Tat exhibited increased rates of malignant lymphoma of B-cell origin one year after birth [24]. However, histological features of lymphoma cells of these mice differed from those characteristic of human BL.

Nef protein also released by HIV-infected cells was recently shown to penetrate B cells and to alter B cell response via direct and indirect mechanisms. Swingler et al. presented evidence that HIV-1 Nef induces ferritin secretion from infected macrophages via activation of NFκB, which causes B cell activation and hypergammaglobulinemia [25]. Recent work by Xu et al. showed that HIV-infected macrophages were able to connect to B cells via nanotubes, which induces transfer of Nef protein to B cells [26]. It should be noted that soluble Nef was also shown to enter B cells *in vivo* and *in vitro* without any nanotubes [27]. In the same study Nef was shown to suppress CD40-dependent immunoglobulin class switching in B cells, which leads to B cell dysfunction and might influence the likelihood of lymphomagenesis.

Conclusions. The majority of HIV-related Burkitt lymphomas are not associated with EBV infection. HIV was shown to activate B lymphocytes and alter B cell response *in vitro* and *in vivo*. Various viral components, such as viral envelope, Tat and Nef proteins can come in contact with B cells or penetrate them and have been shown to be implicated in B cell activation and misregulation of B cell functions. All these factors may contribute to prolonged relocalization of *c-myc* to transcription factories and, therefore, to the proximity of *IgH* gene, which may cause subsequent *c-myc*/*IgH* translocation followed by B cell immortalization and cancer.

Т. М. Цфасман, М. Клібі, А. М. Пічугин, М. Ліпінський, Є. С. Васецький

ВІЛ: зв’язок з лімфомою Беркітта

Резюме

Лімфома Беркітта з високою частотою зустрічається серед ВІЛ-інфікованих пацієнтів порівняно зі здоровими людьми. Така закономірність може бути пов’язана з імуносупресією і значним зменшенням кількості CD4-клітин у людей, хворих на СНІД. Однак є відомості і щодо прямого впливу вірусу на проліферацію та диференціювання В-клітин. Можливі механізми асоціації ВІЛ з лімфомою Беркітта можуть включати як взаємодію самого вірусу з В-клітинами, так і роль різних компонентів віріона і вірусних білків (Tat, Nef, gp120, оболонка вірусу). В міні-огляді обговорюється вплив ВІЛ і білків ВІЛ на транслокацію c-myc/IgH, характерну для клітин лімфоми Беркітта.

Ключові слова: лімфома Беркітта, утворення лімфом, ВІЛ-1.

Т. М. Цфасман, М. Клиби, А. М. Пичугин, М. Липинский, Е. С. Васецкий

ВИЛ: связь с лимфомой Беркитта

Резюме

Лимфома Беркитта встречается с большей частотой среди ВИЧ-инфицированных пациентов по сравнению со здоровыми людьми. Эта закономерность может быть связана с иммуносупрессией и значительным уменьшением количества CD4-клеток у людей,

больных СПИДом. Однако есть данные и о прямом влиянии вируса на пролиферацию и дифференцировку В-клеток. Возможные механизмы ассоциации ВИЧ с лимфомой Беркитта могут включать в себя как взаимодействие самого вируса с В-клетками, так и роль различных компонентов вириона и вирусных белков (Tat, Nef, gp120, оболочка вируса). В миниобзоре обсуждается влияние ВИЧ и белков ВИЧ на транслокацию c-myc/IgH, характерную для клеток лимфомы Беркитта.

Ключевые слова: лимфома Беркитта, возникновение лимфом, ВИЧ-1,гены иммуноглобулинов.

REFERENCES

1. *Bellan C., Lazzi S., De Falco G., Nyongo A., Giordano A., Leoncini L.* Burkitt's lymphoma: new insights into molecular pathogenesis // J. Clin. Pathol.–2003.–**56**, N 3.–P. 188–192.
2. *Bibas M., Antinori A.* EBV and HIV-related lymphoma // Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.–2009.–**1**, N 2.–e2009032.
3. *Engels E. A., Biggar R. J., Hall H. I., Cross H., Crutchfield A., Finch J. L., Grigg R., Hylton T., Pawlish K. S., McNeel T. S., Goedert J. J.* Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States // Int. J. Cancer.–2008.–**123**, N 1.–P. 187–194.
4. *Joab I., Triki H., de Saint Martin J., Perricaudet M., Nicolas J. C.* Detection of anti-Epstein-Barr virus trans-activator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with human immunodeficiency virus // J. Infect. Dis.–1991.–**163**, N 1.–P. 53–56.
5. *Lennette E. T., Busch M. P., Hecht F. M., Levy J. A.* Potential herpesvirus interaction during HIV type 1 primary infection // AIDS Res. Hum. Retroviruses.–2005.–**21**, N 10.–P. 869–875.
6. *Engels E. A., Pfeiffer R. M., Landgren O., Moore R. D.* Immunologic and virologic predictors of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma in the highly active antiretroviral therapy era // J. Acquir. Immune Defic. Syndr.–2010.–**54**, N 1.–P. 78–84.
7. *Guiguet M., Boue F., Cadranel J., Lang J. M., Rosenthal E., Costagliola D.; Clinical Epidemiology Group of the FHDH-ANRS CO4 cohort* Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study // Lancet Oncol.–2009.–**10**, N 12.–P. 1152–1159.
8. *Silverberg M. J., Chao C., Leyden W. A., Xu L., Horberg M. A., Klein D., Towner W. J., Dubrow R., Quesenberry C. P. Jr., Neugebauer R. S., Abrams D. I.* HIV infection, immunodeficiency, viral replication, and the risk of cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.–2011.–**20**, N 12.–P. 2551–2559.
9. *Grogg K. L., Miller R. F., Dogan A.* HIV infection and lymphoma // J. Clin. Pathol.–2007.–**60**, N12.–P. 1365–1372.
10. *Janz S. Myc* translocations in B cell and plasma cell neoplasms // DNA Repair (Amst).–2006.–**5**, N 9–10.–P. 1213–1224.
11. *Nikiforova M. N., Stringer J. R., Blough R., Medvedovic M., Fagin J. A., Nikiforov Y. E.* Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells // Science.–2000.–**290**, N 5489.–P. 138–141.
12. *Osborne C. S., Chakalova L., Mitchell J. A., Horton A., Wood A. L., Bolland D. J., Corcoran A. E., Fraser P. Myc* dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by *Igh* // PLoS Biol.–2007.–**5**, N 8.– e192.
13. *Moir S., Fauci A. S.* Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease // J. Allergy Clin. Immunol.–2008.–**122**, N 1.–P. 12–19.
14. *Moir S., Fauci A. S.* B cells in HIV infection and disease // Nat. Rev. Immunol.–2009.–**9**, N 4.–P. 235–245.
15. *Shen X., Tomaras G. D.* Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication // Curr. HIV/AIDS Rep.–2011.–**8**, N 1.– P. 23–30.
16. *Grulich A. E., Wan X., Law M. G., Milliken S. T., Lewis C. R., Garsia R. J., Gold J., Finlayson R. J., Cooper D. A., Kaldor J. M.* B-cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS // AIDS.–2000.–**14**, N 2.–P. 133–140.
17. *Fritsch L., Marechal V., Schneider V., Barthet C., Rozenbaum W., Moisan-Coppey M., Coppey J., Nicolas J. C.* Production of HIV- 1 by human B cells infected *in vitro*: characterization of an EBV genome-negative B cell line chronically synthetizing a low level of HIV-1 after infection // Virology.–1998.–**244**, N 2.–P. 542–551.
18. *Malaspina A., Moir S., Nickle D. C., Donoghue E. T., Ogwaro K. M., Ehler L. A., Liu S., Mican J. A., Dybul M., Chun T. W., Mullins J. I., Fauci A. S.* Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in $CD4^+$ T cells and circulating in plasma // J. Virol.–2002.–**76**, N 17.–P. 8855–8863.
19. *Moir S., Malaspina A., Li Y., Chun T. W., Lowe T., Adelsberger J., Baseler M., Ehler L. A., Liu S., Davey R. T. Jr., Mican J. A., Fauci A. S.* B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells // J. Exp. Med.–2000.–**192**, N 5.–P. 637–646.
20. *Badr G., Borhis G., Treton D., Moog C., Garraud O., Richard Y.* HIV type 1 glycoprotein 120 inhibits human B cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 12, CC chemokine ligand (CCL) 20, and CCL21 // J. Immunol.–2005.–**175**, N 1.–P. 302–310.
21. *Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B.* The Ins and Outs of HIV-1 Tat // Traffic.–2012.–**13**, N 3.–P. 355–363.
22. *Huang L., Li C. J., Pardee A. B.* Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein activates B lymphocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun.–1997.–**237**, N 2.–P. 461–464.
23. *Lefevre E. A., Krzysiek R., Loret E. P., Galanaud P., Richard Y.* Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naïve, memory, and germinal center B cells // J. Immunol.–1999.–**163**, N 3.–P. 1119–1122.
24. *Kundu R. K., Sangiorgi F., Wu L.Y., Pattengale P. K., Hinton D. R., Gill P. S., Maxson R.* Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma // Blood.–1999.–**94**, N 1.–P. 275–282.
25. *Swingler S., Zhou J., Swingler C., Dauphin A., Greenough T., Jolicoeur P., Stevenson M.* Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS // Cell Host Microbe.–2008.–**4**, N 1.–P. 63–76.
26. *Xu W., Santini P. A., Sullivan J. S., He B., Shan M., Ball S. C., Dyer W. B., Ketas T. J., Chadburn A., Cohen-Gould L., Knowles D. M., Chiu A., Sanders R. W., Chen K., Cerutti A.* HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits // Nat. Immunol.–2009.–**10**, N 9.–P. 1008–1017.
27. *Qiao X., He B., Chiu A., Knowles D. M., Chadburn A., Cerutti A.* Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells // Nat. Immunol.–2006.–**7**, N 3.–P. 302–310.

Received 12.02.12

ARTICLE 2 (En prépration)

HIV-Tat protein induces relocalisation of *CMYC* gene to the *IGH* gene locus in human B cells

Manel Klibi[1*], Tatyana Tsfasman[1,2*], Stéphanie Bury-Moné[3], Frédéric Subra[3], Diana Markozashvili[1], Andrei Pichugin[1], Anna Barat[1], Mark Lipinski[1] and Yegor Vassetzky[1]

1 – UMR8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France;

2 – Laboratory of genetics of RNA viruses, virology department, Mechnikov Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 115080, Russia

3 – Ecole normale supérieure de Cachan, France

*These authors equally contributed to the work presented in the article

ABSTRACT

HIV-Tat protein is known to perturb nuclear organization in different cell types and to cause a number of B-lymphocyte abnormalities. We decided to reveal if Tat may play a role in the translocation of the *CMYC* gene to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene locus (t 8;14) that is characteristic of most Burkitt lymphoma cases. We have shown by FISH technique that in naïve human B cells *CMYC* is located to the nuclear periphery, and *IGH* is near the nuclear center. However, incubation of cells with Tat induced a relocalisation of the *CMYC* towards *IGH* locus, which should facilitate translocation. The similar effect observed with viral supernatant from HIV-producing 293T cells, could be significantly diminished by immunodepletion of Tat and was restored upon addition of Tat. Tat transactivation mutant (Tat-C22) was bearly able to induce *CMYC/IGH* relocalization, which suggests that most of the effect is due to the Tat-induced transactivation.

Congrès et communications

2013- Journées jeunes chercheurs. Participation avec mes travaux « Remaniément nucléaire dans les lymphocytes B provoqué par les virus EBV et VIH-1 » pour l'obtention du prix Hélène Starck.

2013- Le 9ème cours international d'Epigénétique organisé par l'Institut Curie en partenariat avec l'UPMC en Mars 2013.

2012- International meeting "Early events in Human Pathologies", July, 9-12, 2012, Listvyanka, Baikal, Russia. (Tatyana Tsafsman m'a representé et elle a présenté mes travaux sur HIV : implication in Burkitt lymphoma).

2012- Congrès "Epigenetic marks: from code to mechanisms" Novembre 2012, UPMC (Paris).

2011- LYMPHOMES Que nous apprend l'Afrique ?

Nouveaux éclairages sur les classifications, l'épidémiologie, la biologie et la recherche à l'Institut Curie Paris, 9 – 10 May 2011

2010- International meeting "Early events in Human Pathologies", "Epstein-Barr virus contributes to Burkitt's lymphoma by rearranging the nuclei of B lymphocytes".

M. Klibi, A. Pichugin, V. Ribrag, O. V. Iarovaia, M. Lipinski, S.V. Razin, Y. S. Vassetzky.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abeysinghe, S.S., Chuzhanova, N., Krawczak, M., Ball, E.V. and Cooper, D.N. (2003) Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat*, 22, 229-244.

Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*, 59, 284-291.

Agrawala, P.K., Adhikari, J.S. and Chaudhury, N.K. (2010) Lymphocyte chromosomal aberration assay in radiation biodosimetry. *J Pharm Bioallied Sci*, 2, 197-201.

Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W. and Bussolino, F. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*, 2, 1371-1375.

Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G. and Chen, J. (1992) VDJ recombination. *Immunol Today*, 13, 306-314.

Amadori, A., Zamarchi, R., Veronese, M.L., Panozzo, M., Barelli, A., Borri, A., Sironi, M., Colotta, F., Mantovani, A. and Chieco-Bianchi, L. (1991) B cell activation during HIV-1 infection. II. Cell-to-cell interactions and cytokine requirement. *J Immunol*, 146, 57-62.

Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C. and Sternglanz, R. (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*, 394, 592-595.

Aoki, Y. and Tosato, G. (2004) HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood*, 104, 810-814.

Apolloni, A., Hooker, C.W., Mak, J. and Harrich, D. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication. *J Virol*, 77, 9912-9921.

Arbach, H., Viglasky, V., Lefeu, F., Guinebretiere, J.M., Ramirez, V., Bride, N., Boualaga, N., Bauchet, T., Peyrat, J.P., Mathieu, M.C., Mourah, S., Podgorniak, M.P., Seignerin, J.M., Takada, K. and Joab, I. (2006) Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol*, 80, 845-853.

Arthur, G., Nduba, V.N., Kariuki, S.M., Kimari, J., Bhatt, S.M. and Gilks, C.F. (2001) Trends in bloodstream infections among human immunodeficiency virus-infected adults admitted to a hospital in Nairobi, Kenya, during the last decade. *Clin Infect Dis*, 33, 248-256.

Astrin, S.M. and Laurence, J. (1992) Human immunodeficiency virus activates c-myc and Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 651, 422-432.

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et *al*. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-211.

Barboric, M., Taube, R., Nekrep, N., Fujinaga, K. and Peterlin, B.M. (2000) Binding of Tat to TAR and recruitment of positive transcription elongation factor b occur independently in bovine immunodeficiency virus. *J Virol*, 74, 6039-6044.

Barillari, G., Gendelman, R., Gallo, R.C. and Ensoli, B. (1993) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7941-7945.

Bartova, E., Galiova, G., Krejci, J., Harnicarova, A., Strasak, L. and Kozubek, S. (2008) Epigenome and chromatin structure in human embryonic stem cells undergoing differentiation. *Dev Dyn*, 237, 3690-3702.

Bartova, E., Kozubek, S., Jirsova, P., Kozubek, M., Lukasova, E., Skalnikova, M., Cafourkova, A., Koutna, I. and Pasekova, R. (2001) Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma*, 110, 360-370.

Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001) Telomere position effect in human cells. *Science*, 292, 2075-2077.

Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R. and Rosch, P. (1995) Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol*, 247, 529-535.

Bennasser, Y. and Bahraoui, E. (2002) HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta. *Faseb J*, 16, 546-554.

Beral, V., Banks, E., Reeves, G. and Appleby, P. (1999) Use of HRT and the subsequent risk of cancer. *J Epidemiol Biostat*, 4, 191-210; discussion 210-195.

Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 142-148.

Berkhout, B., Silverman, R.H. and Jeang, K.T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, 59, 273-282.

Bernard-Gallon, D., Bosviel, R., Delort, L., Fontana, L., Chamoux, A., Rabiau, N., Kwiatkowski, F., Chalabi, N., Satih, S. and Bignon, Y.J. (2008) DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk. *Mol Cancer*, 7, 36.

Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*, 19, 203-211.

Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, 25, 31-41.

Blankson, J.N., Persaud, D. and Siliciano, R.F. (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*, 53, 557-593.

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

Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. and Jackson, S.P. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell*, 80, 813-823.

Bogerd, H.P., Wiegand, H.L., Bieniasz, P.D. and Cullen, B.R. (2000) Functional differences between human and bovine immunodeficiency virus Tat transcription factors. *J Virol*, 74, 4666-4671.

Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R. and Cremer, T. (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*, 3, e157.

Bornkamm, G.W. (2009a) Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol*, 19, 351-365.

Bornkamm, G.W. (2009b) Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer*, 124, 1745-1755.

Borza, C.M., Morgan, A.J., Turk, S.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2004) Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol*, 78, 5007-5014.

Bowater, R.P., Borts, R.H. and White, M.F. (2009) DNA damage: from causes to cures. *Biochem Soc Trans*, 37, 479-481.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*, 10, 211-219.

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

Branco, M.R. and Pombo, A. (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*, 4, e138.

Brown, D.T. (2001) Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol*, 2, REVIEWS0006.

Bultema, R., Longnecker, R. and Swanson-Mungerson, M. (2009) Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene*, 28, 1471-1476.

Campbell, G.R., Loret, E.P. and Spector, S.A. (2009) HIV-1 clade B Tat, but not clade C Tat, increases X4 HIV-1 entry into resting but not activated CD4+ T cells. *J Biol Chem*, 285, 1681-1691.

Carbone, A., Gloghini, A. and Dotti, G. (2008) EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist*, 13, 577-585.

Chang, Y., Tung, C.H., Huang, Y.T., Lu, J., Chen, J.Y. and Tsai, C.H. (1999) Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *J Virol*, 73, 8857-8866.

Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 7, 2745-2752.

Chen, D., Wang, M., Zhou, S. and Zhou, Q. (2002) HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Embo J*, 21, 6801-6810.

Chesnokova, L.S., Nishimura, S.L. and Hutt-Fletcher, L.M. (2009) Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20464-20469.

Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R.L., Lewis, S.M., Molinie, B., Ho, Y.J., Myers, D.R., Choi, V.W., Compagno, M., Malkin, D.J., Neuberg, D., Monti, S., Giallourakis, C.C., Gostissa, M. and Alt, F.W. (2011) Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*, 147, 107-119.

Combriato, G. and Klobeck, H.G. (2002) Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J Immunol*, 168, 1259-1266.

Cook, P.R. (1999) The organization of replication and transcription. *Science*, 284, 1790-1795.

Cook, S.A., Matsui, T., Li, L. and Rosenzweig, A. (2002) Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J Biol Chem*, 277, 22528-22533.

Corneo, B., Moshous, D., Gungor, T., Wulffraat, N., Philippet, P., Le Deist, F.L., Fischer, A. and de Villartay, J.P. (2001) Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood*, 97, 2772-2776.

Costello, R. (2010) [Pulmonary arterial hypertension and malignant hematologic disorders]. *Rev Med Interne*, 31, 621-625.

Cremer, C. and Gray, J.W. (1982) Application of the BrdU/thymidine method to flow cytogenetics: differential quenching/enhancement of Hoechst 33258 fluorescence of late-replicating chromosomes. *Somatic Cell Genet*, 8, 319-327.

Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T. (2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*, 9, 541-567.

Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2, 292-301.

Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, 145, 1119-1131.

Cullen, B.R. (1986) Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell*, 46, 973-982.

Cullen, B.R. (1990) The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*, 63, 655-657.

Daelemans, D., Schols, D., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Hatse, S., van Dooren, S., Hamy, F., Klimkait, T., de Clercq, E. and VanDamme, A.M. (2000) A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol*, 57, 116-124.

Dang, C.V., Resar, L.M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D. and Zeller, K. (1999) Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*, 253, 63-77.

Davis, A. and Bradley, A. (1993) Mutation of N-myc in mice: what does the phenotype tell us? *Bioessays*, 15, 273-275.

De Milito, A. (2004) B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res*, 2, 11-21.

Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. and Beaumelle, B. (2011) The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*, 13, 355-363.

Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A. and Valerio, R. (1989) Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6925-6929.

Dolcetti, R. and Menezes, J. (2003) Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: new immunobiological and molecular insights on a long-standing etiopathogenic association. *Adv Cancer Res*, 87, 127-157.

Dyer, M.J., Akasaka, T., Capasso, M., Dusanjh, P., Lee, Y.F., Karran, E.L., Nagel, I., Vater, I., Cario, G. and Siebert, R. (2009) Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood*, 115, 1490-1499.

Emilie, D. (1993) [Cytokines and HIV infection]. *Pathol Biol (Paris)*, 41, 449-452.

Engels, W.R., Johnson-Schlitz, D.M., Eggleston, W.B. and Sved, J. (1990) High-frequency P element loss in Drosophila is homolog dependent. *Cell*, 62, 515-525.

Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S.Z., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1990) Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, 345, 84-86.

Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R.A., Wingfield, P. and Gallo, R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol*, 67, 277-287.

Epstein, M.A. and Achong, B.G. (1977) Pathogenesis of infectious mononucleosis. *Lancet*, 2, 1270-1273.

Ezhevsky, S.A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Gius, D.R., Wei, M.C. and Dowdy, S.F. (1997) Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10699-10704.

Farrell, P.J. (2002) Cell-switching and kissing. *Nat Med*, 8, 559-560.

Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 664-668.

Federico, C., Cantarella, C.D., Scavo, C., Saccone, S., Bed'Hom, B. and Bernardi, G. (2005) Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-richest chromosome regions at interphase. *Chromosome Res*, 13, 785-793.

Federico, C., Saccone, S., Andreozzi, L., Motta, S., Russo, V., Carels, N. and Bernardi, G. (2004) The pig genome: compositional analysis and identification of the gene-richest regions in chromosomes and nuclei. *Gene*, 343, 245-251.

Feederle, R., Bartlett, E.J. and Delecluse, H.J. (2010) Epstein-Barr virus genetics: talking about the BAC generation. *Herpesviridae*, 1, 6.

Feinberg, M.B., Baltimore, D. and Frankel, A.D. (1991) The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4045-4049.

Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M. and Beltram, F. (2003) Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol Ther*, 8, 284-294.

Fournier, P.E., Jensenius, M., Laferl, H., Vene, S. and Raoult, D. (2002) Kinetics of antibody responses in Rickettsia africae and Rickettsia conorii infections. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 324-328.

Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B. and Klein, G. (1985) gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 1490-1493.

Frankel, A.D. (1992) Activation of HIV transcription by Tat. *Curr Opin Genet Dev*, 2, 293-298.

Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55, 1189-1193.

Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. and Mathis, D. (1993) Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 261, 1175-1178.

Godshall, S.E. and Kirchner, J.T. (2000) Infectious mononucleosis. Complexities of a common syndrome. *Postgrad Med*, 107, 175-179, 183-174, 186.

Gold, M.O., Yang, X., Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1998) PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo. *J Virol*, 72, 4448-4453.

Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A. and Lees-Miller, S.P. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *Embo J*, 25, 3880-3889.

Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72, 131-142.

Grawunder, U., Zimmer, D. and Leiber, M.R. (1998) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol*, 8, 873-876.

Gregoire, C., Peloponese, J.M., Jr., Esquieu, D., Opi, S., Campbell, G., Solomiac, M., Lebrun, E., Lebreton, J. and Loret, E.P. (2001) Homonuclear (1)H-NMR assignment and structural characterization of human immunodeficiency virus type 1 Tat Mal protein. *Biopolymers*, 62, 324-335.

Grulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O. and Vajdic, C.M. (2007) Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*, 370, 59-67.

Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F. and Lieber, M.R. (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *Embo J*, 26, 1010-1023.

Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453, 948-951.

Gunven, P., Klein, G., Klein, E., Norin, T. and Singh, S. (1980) Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. *Int J Cancer*, 25, 711-719.

Gupta, S., Boppana, R., Mishra, G.C., Saha, B. and Mitra, D. (2008) HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner. *J Immunol*, 180, 79-88.

Haan, K.M., Kwok, W.W., Longnecker, R. and Speck, P. (2000) Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol*, 74, 2451-2454.

Habermann, F.A., Biet, C. and Fries, R. (2001) Chromosomal localization of the genes encoding SCNN1A, BTG1, IFNG and MAOA on chicken chromosome 1 by fluorescence in-situ hybridization. *Chromosome Res*, 9, 515-518.

Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C.C. and Thorley-Lawson, D.A. (2009) The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog*, 5, e1000496.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. and et *al*. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-1392.

Hauber, J., Perkins, A., Heimer, E.P. and Cullen, B.R. (1987) Trans-activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6364-6368.

Haynes, B.F., Ma, B., Montefiori, D.C., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Sutherland, L.L., Scearce, R.M., Denton, C., Xia, S.M., Korber, B.T. and Liao, H.X. (2006) Analysis of HIV-1 subtype B third variable region peptide motifs for induction of neutralizing antibodies against HIV-1 primary isolates. *Virology*, 345, 44-55.

He, B., Qiao, X., Klasse, P.J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D.M., Moore, J.P. and Cerutti, A. (2006) HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol*, 176, 3931-3941.

Hefferin, M.L. and Tomkinson, A.E. (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, 4, 639-648.

Henle, W. and Henle, G. (1968) Effect of arginine-deficient media on the herpes-type virus associated with cultured Burkitt tumor cells. *J Virol*, 2, 182-191.

Henle, W. and Henle, G. (1969) The relation between the Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma and cancer of the postnasal space. *East Afr Med J*, 46, 402-406.

Ho, S.Y., Huang, P.C., Guo, H.R., Chang, W.H., Chen, R.J., Wei, B.L., Wu, W.J., Tai, C. and Wang, Y.J. (2006) Mechanisms of apoptosis induction and cell cycle regulation in irradiated leukemia U937 cells and enhancement by arsenic trioxide. *Radiat Res*, 165, 390-399.

Hu, M., Wang, J., Chen, P. and Reilly, R.M. (2006) HIV-1 Tat peptide immunoconjugates differentially sensitize breast cancer cells to selected antiproliferative agents that induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF-1/CIP-1. *Bioconjug Chem*, 17, 1280-1287.

Huang, L., Li, C.J. and Pardee, A.B. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein activates B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 461-464.

Huret, J.L., Senon, S., Bernheim, A. and Dessen, P. (2004) An Atlas on genes and chromosomes in oncology and haematology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50, 805-807.

Hwang, I.Y., Park, C., Harrison, K. and Kehrl, J.H. (2009) TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J Exp Med*, 206, 2641-2657.

Iborra, F.J., Pombo, A., McManus, J., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1996) The topology of transcription by immobilized polymerases. *Exp Cell Res*, 229, 167-173.

Imai, S., Nishikawa, J. and Takada, K. (1998) Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol*, 72, 4371-4378.

Jackson, S.P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23, 687-696.

Jacobson, M.A. and Bredt, B.M. (2002) Association of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ T lymphocyte reactivity and protective immunity against acquired immunodeficiency syndrome-related CMV retinitis. *J Infect Dis*, 186, 1701-1702; author reply 1702-1703.

Jagannathan, P., Osborne, C.M., Royce, C., Manion, M.M., Tilton, J.C., Li, L., Fischer, S., Hallahan, C.W., Metcalf, J.A., McLaughlin, M., Pipeling, M., McDyer, J.F., Manley, T.J., Meier, J.L., Altman, J.D., Hertel, L., Davey, R.T., Jr., Connors, M. and Migueles, S.A. (2009) Comparisons of CD8+ T cells specific for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus reveal differences in frequency, immunodominance, phenotype, and interleukin-2 responsiveness. *J Virol*, 83, 2728-2742.

Jeang, K.T. and Gatignol, A. (1994) Comparison of regulatory features among primate lentiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 188, 123-144.

Jeggo, P.A. (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet*, 38, 185-218.

Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K. and Singh, S.K. (2011) Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther*, 11, 269-283.

Jones, K.A. (1997) Taking a new TAK on tat transactivation. *Genes Dev*, 11, 2593-2599.

Ju, S.M., Song, H.Y., Lee, J.A., Lee, S.J., Choi, S.Y. and Park, J. (2009) Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes. *Exp Mol Med*, 41, 86-93.

Junker, A.K., Thomas, E.E., Radcliffe, A., Forsyth, R.B., Davidson, A.G. and Rymo, L. (1991) Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci*, 302, 220-223.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B. (1999) The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*, 73, 4481-4484.

Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330, 489-493.

Keeney, S. and Neale, M.J. (2006) Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans*, 34, 523-525.

Kelly, G.L. and Rickinson, A.B. (2007) Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 277-284.

Kennedy, G. and Sugden, B. (2003) EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol Cell Biol*, 23, 6901-6908.

Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S. and Takada, K. (2000) Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *Embo J*, 19, 6742-6750.

Klein, F., van Rood, J.J., van Furth, R. and Radema, H. (1968) IgM-IgG cryoglobulinaemia with IgM paraprotein component. *Clin Exp Immunol*, 3, 703-716.

Kobayashi, R., Takeuchi, H., Sasaki, M., Hasegawa, M. and Hirai, K. (1998) Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. *Arch Virol*, 143, 803-813.

Koehler, D., Zakhartchenko, V., Froenicke, L., Stone, G., Stanyon, R., Wolf, E., Cremer, T. and Brero, A. (2009) Changes of higher order chromatin arrangements during major genome activation in bovine preimplantation embryos. *Exp Cell Res*, 315, 2053-2063.

Koering, C.E., Pollice, A., Zibella, M.P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J.F. and Gilson, E. (2002) Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep*, 3, 1055-1061.

Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T. and Takada, K. (1999) Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol*, 73, 9827-9831.

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.

Komori, T., Okada, A., Stewart, V. and Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, 261, 1171-1175.

Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G. and Singh, H. (2002) Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*, 296, 158-162.

Kozubek, S., Lukasova, E., Mareckova, A., Skalnikova, M., Kozubek, M., Bartova, E., Kroha, V., Krahulcova, E. and Slotova, J. (1999) The topological organization of

chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma*, 108, 426-435.

Kundu, R.K., Sangiorgi, F., Wu, L.Y., Pattengale, P.K., Hinton, D.R., Gill, P.S. and Maxson, R. (1999) Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood*, 94, 275-282.

Kupper, J.H., Muller, M. and Wolf, I. (1999) NAD(+) consumption in carcinogen-treated hamster cells overexpressing a dominant negative mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*, 265, 525-529.

Kuppers, R., Schmitz, R., Distler, V., Renne, C., Brauninger, A. and Hansmann, M.L. (2005) Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl*, 26-33.

Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A. and Chinnadurai, G. (1989) Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res*, 17, 3551-3561.

Kutok, J.L. and Wang, F. (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.

Lane, H.C., Masur, H., Edgar, L.C., Whalen, G., Rook, A.H. and Fauci, A.S. (1983) Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 309, 453-458.

Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D. and Gosselin, J. (1998) Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood*, 92, 291-299.

Laspia, M.F., Rice, A.P. and Mathews, M.B. (1989) HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*, 59, 283-292.

Laspia, M.F., Rice, A.P. and Mathews, M.B. (1990) Synergy between HIV-1 Tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes Dev*, 4, 2397-2408.

Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimber-Strobl, U. and Bornkamm, G.W. (1994) Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol*, 68, 6947-6958.

Lazzi, S., Bellan, C., De Falco, G., Cinti, C., Ferrari, F., Nyongo, A., Claudio, P.P., Tosi, G.M., Vatti, R., Gloghini, A., Carbone, A., Giordano, A., Leoncini, L. and Tosi, P. (2002) Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol*, 33, 723-731.

Lefevre, E.A., Krzysiek, R., Loret, E.P., Galanaud, P. and Richard, Y. (1999) Cutting edge: HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells. *J Immunol*, 163, 1119-1122.

Levesque, M.C., Moody, M.A., Hwang, K.K., Marshall, D.J., Whitesides, J.F., Amos, J.D., Gurley, T.C., Allgood, S., Haynes, B.B., Vandergrift, N.A., Plonk, S., Parker, D.C., Cohen, M.S., Tomaras, G.D., Goepfert, P.A., Shaw, G.M., Schmitz, J.E., Eron, J.J., Shaheen, N.J., Hicks, C.B., Liao, H.X., Markowitz, M., Kelsoe, G., Margolis, D.M. and Haynes, B.F. (2009) Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*, 6, e1000107.

Li, C., Shi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Liu, A., Jin, Y., Yu, Y., Bai, J., Chen, D., Gendron, C., Liu, X. and Fu, S. (2010) Dynamic changes of territories 17 and 18 during EBV-infection of human lymphocytes. *Mol Biol Rep*, 37, 2347-2354.

Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V. and Pardee, A.B. (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, 268, 429-431.

Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S. and Pardee, A.B. (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1839-1842.

Li, J.C., Lee, D.C., Cheung, B.K. and Lau, A.S. (2005) Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett*, 579, 3055-3062.

Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S. and Dekker, J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326, 289-293.

Liebowitz, D., Mannick, J., Takada, K. and Kieff, E. (1992) Phenotypes of Epstein-Barr virus LMP1 deletion mutants indicate transmembrane and amino-terminal cytoplasmic domains necessary for effects in B-lymphoma cells. *J Virol*, 66, 4612-4616.

Lin, Y.H., Chang, C.C., Wong, C.W. and Teng, S.C. (2009) Recruitment of Rad51 and Rad52 to short telomeres triggers a Mec1-mediated hypersensitivity to double-stranded DNA breaks in senescent budding yeast. *PLoS One*, 4, e8224.

Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M.L. and de Groot, C. (1994) Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med*, 179, 1173-1184.

Lucas, J.N. and Cervantes, E. (2002) Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase. *Int J Radiat Biol*, 78, 449-455.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108, 781-794.

Magrath, D. and Reeve, P. (1993) On the role of the World Health Organization in the development of Sabin vaccines. *Biologicals*, 21, 345-348.

Mahlknecht, U., Dichamp, I., Varin, A., Van Lint, C. and Herbein, G. (2008) NF-kappaB-dependent control of HIV-1 transcription by the second coding exon of Tat in T cells. *J Leukoc Biol*, 83, 718-727.

Maizels, N. (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet*, 39, 23-46.

Malaspina, A., Moir, S., DiPoto, A.C., Ho, J., Wang, W., Roby, G., O'Shea, M.A. and Fauci, A.S. (2008) CpG oligonucleotides enhance proliferative and effector responses of B Cells in HIV-infected individuals. *J Immunol*, 181, 1199-1206.

Malaspina, A., Moir, S., Nickle, D.C., Donoghue, E.T., Ogwaro, K.M., Ehler, L.A., Liu, S., Mican, J.A., Dybul, M., Chun, T.W., Mullins, J.I. and Fauci, A.S. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma. *J Virol*, 76, 8855-8863.

Mani, R.S., Tomlins, S.A., Callahan, K., Ghosh, A., Nyati, M.K., Varambally, S., Palanisamy, N. and Chinnaiyan, A.M. (2009) Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science*, 326, 1230.

Manic, G., Maurin-Marlin, A., Galluzzi, L., Subra, F., Mouscadet, J.F. and Bury-Mone, S. (2012) 3' self-inactivating long terminal repeat inserts for the modulation of transgene expression from lentiviral vectors. *Hum Gene Ther Methods*, 23, 84-97.

Mann, D.A. and Frankel, A.D. (1991) Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *Embo J*, 10, 1733-1739.

Marban, C., Su, T., Ferrari, R., Li, B., Vatakis, D., Pellegrini, M., Zack, J.A., Rohr, O. and Kurdistani, S.K. (2011) Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. *PLoS One*, 6, e26894.

Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.M., Jager, U., McBlane, F. and Nadel, B. (2006) Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair (Amst)*, 5, 1246-1258.

Marcuzzi, A., Weinberger, J. and Weinberger, O.K. (1992) Transcellular activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in cocultured lymphocytes. *J Virol*, 66, 4228-4232.

Martinez-Maza, O., Moody, D.J., Rezai, A.R., Ellison, G.W., Myers, L.W., Tourtellotte, W.W. and Fahey, J.L. (1987) Increased spontaneous immunoglobulin secretion associated with cyclophosphamide-induced immune suppression. *J Clin Immunol*, 7, 107-113.

Martou, G. and De Boni, U. (2000) Nuclear topology of murine, cerebellar Purkinje neurons: changes as a function of development. *Exp Cell Res*, 256, 131-139.

Matsui, M., Warburton, R.J., Cogswell, P.C., Baldwin, A.S., Jr. and Frelinger, J.A. (1996) Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 11, 233-240.

Mayer, R., Brero, A., von Hase, J., Schroeder, T., Cremer, T. and Dietzel, S. (2005) Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol*, 6, 44.

Mayne, M., Holden, C.P., Nath, A. and Geiger, J.D. (2000) Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages. *J Immunol*, 164, 6538-6542.

Mayol, K., Munier, S., Beck, A., Verrier, B. and Guillon, C. (2007) Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity. *Vaccine*, 25, 6047-6060.

Mayr, C., Jasencakova, Z., Meister, A., Schubert, I. and Zink, D. (2003) Comparative analysis of the functional genome architecture of animal and plant cell nuclei. *Chromosome Res*, 11, 471-484.

McClintock, B. (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*, 26, 234-282.

Meffre, E., Papavasiliou, F., Cohen, P., de Bouteiller, O., Bell, D., Karasuyama, H., Schiff, C., Banchereau, J., Liu, Y.J. and Nussenzweig, M.C. (1998) Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med*, 188, 765-772.

Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Prodinger, W.M., Schwendinger, M.G., Chan, P., Jager, M., Schwarzmann, F., Recheis, H., Fontaine, M. and Dierich, M.P. (1999) Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol*, 73, 7722-7733.

Menin, C., Ometto, L., Veronesi, A., Roncella, S., Corneo, B., Montagna, M., Coppola, V., Veronese, M.L., Indraccolo, S., Amadori, A., De Rossi, A., Ferrarini, M., Chieco-Bianchi, L. and D'Andrea, E. (1996) Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) type and variant in spontaneous lymphoblastoid cells and Hu-SCID mouse tumours. *Mol Cell Probes*, 10, 453-461.

Minowada, J., Klein, G., Clifford, P., Klein, E. and Moore, G.E. (1967) Studies of Burkitt lymphoma cells. I. Establishment of a cell line (B35M) and its characteristics. *Cancer*, 20, 1430-1437.

Moir, S. and Fauci, A.S. (2008) Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 12-19; quiz 20-11.

Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.W., Lowe, T., Adelsberger, J., Baseler, M., Ehler, L.A., Liu, S., Davey, R.T., Jr., Mican, J.A. and Fauci, A.S. (2000) B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, 192, 637-646.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A. and de Villartay, J.P. (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105, 177-186.

Naher, H. and Petzoldt, D. (1992) [Epstein-Barr virus infection--a lympho- and epitheliotropic infection]. *Hautarzt*, 43, 114-119.

Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108, 475-487.

Nekhai, S., Jerebtsova, M., Jackson, A. and Southerland, W. (2007) Regulation of HIV-1 transcription by protein phosphatase 1. *Curr HIV Res*, 5, 3-9.

Neusser, M., Schubel, V., Koch, A., Cremer, T. and Muller, S. (2007) Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma*, 116, 307-320.

Nikiforova, M.N., Stringer, J.R., Blough, R., Medvedovic, M., Fagin, J.A. and Nikiforov, Y.E. (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*, 290, 138-141.

Notermans, D.W., de Jong, J.J., Goudsmit, J., Bakker, M., Roos, M.T., Nijholt, L., Cremers, J., Hellings, J.A., Danner, S.A. and de Ronde, A. (2001) Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17, 1003-1008.

Nunnari, G., Smith, J.A. and Daniel, R. (2008) HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? *J Exp Clin Cancer Res*, 27, 3.

Nyagol, J., Leucci, E., Onnis, A., De Falco, G., Tigli, C., Sanseverino, F., Torriccelli, M., Palummo, N., Pacenti, L., Santopietro, R., Spina, D., Gichangi, P., Muchiri, L., Lazzi, S., Petraglia, F., Leoncini, L. and Giordano, A. (2006) The effects of HIV-1 Tat protein on cell cycle during cervical carcinogenesis. *Cancer Biol Ther*, 5, 684-690.

Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*, 36, 1065-1071.

Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E. and Fraser, P. (2007) Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*, 5, e192.

Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S. and Verdin, E. (1997) Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science*, 275, 1481-1485.

Papantonis, A., Larkin, J.D., Wada, Y., Ohta, Y., Ihara, S., Kodama, T. and Cook, P.R. (2010) Active RNA polymerases: mobile or immobile molecular machines? *PLoS Biol*, 8, e1000419.

Parada, L. and Misteli, T. (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*, 12, 425-432.

Parada, L.A., Sotiriou, S. and Misteli, T. (2004) Spatial genome organization. *Exp Cell Res*, 296, 64-70.

Pegtel, D.M., Middeldorp, J. and Thorley-Lawson, D.A. (2004) Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol*, 78, 12613-12624.

Pfeiffer, P., Goedecke, W. and Obe, G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15, 289-302.

Pickersgill, H., Kalverda, B., de Wit, E., Talhout, W., Fornerod, M. and van Steensel, B. (2006) Characterization of the Drosophila melanogaster genome at the nuclear lamina. *Nat Genet*, 38, 1005-1014.

Poggi, A. and Zocchi, M.R. (2006) HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B. *Clin Dev Immunol*, 13, 369-372.

Portnoy, J., Ahronheim, G.A., Ghibu, F., Clecner, B. and Joncas, J.H. (1984) Recovery of Epstein-Barr virus from genital ulcers. *N Engl J Med*, 311, 966-968.

Postberg, J., Alexandrova, O., Cremer, T. and Lipps, H.J. (2005) Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J Cell Sci*, 118, 3973-3983.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2011) [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother*, 16, 1-10.

Reynaud, S., Duchiron, C. and Deschaux, P. (2001) 3-Methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (Cyprinus carpio L) macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 175, 1-9.

Rickinson, A.B. and Lane, P.J. (2000) Epstein-Barr virus: Co-opting B-cell memory and migration. *Curr Biol*, 10, R120-123.

Rickinson, A.B., Lee, S.P. and Steven, N.M. (1996) Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol*, 8, 492-497.

Rieckmann, P., Poli, G., Kehrl, J.H. and Fauci, A.S. (1991) Activated B lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals induce virus expression in infected T cells and a promonocytic cell line, U1. *J Exp Med*, 173, 1-5.

Rodriguez, A., Troye-Blomberg, M., Lindroth, K., Ivanyi, J., Singh, M. and Fernandez, C. (2003) B- and T-cell responses to the mycobacterium surface antigen PstS-1 in the respiratory tract and adjacent tissues. Role of adjuvants and routes of immunization. *Vaccine*, 21, 458-467.

Romani, B., Engelbrecht, S. and Glashoff, R.H. (2010) Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*, 91, 1-12.

Rubartelli, A., Poggi, A., Sitia, R. and Zocchi, M.R. (1998) HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today*, 19, 543-545.

Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A. and Rosen, C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*, 63, 1-8.

Ruf, I.K. and Sample, J. (1999) Repression of Epstein-Barr virus EBNA-1 gene transcription by pRb during restricted latency. *J Virol*, 73, 7943-7951.

Ruprecht, C.R. and Lanzavecchia, A. (2006) Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*, 36, 810-816.

Saccone, S., Federico, C. and Bernardi, G. (2002) Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Gene*, 300, 169-178.

Sancar, A. and Reardon, J.T. (2004) Nucleotide excision repair in E. coli and man. *Adv Protein Chem*, 69, 43-71.

Scala, G., Ruocco, M.R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I. and Venuta, S. (1994) The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med*, 179, 961-971.

Schardin, M., Cremer, T., Hager, H.D. and Lang, M. (1985) Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum Genet*, 71, 281-287.

Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59, 1035-1048.

Schnittman, S.M., Lane, H.C., Higgins, S.E., Folks, T. and Fauci, A.S. (1986) Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science*, 233, 1084-1086.

Schoenfelder, S., Clay, I. and Fraser, P. (2010a) The transcriptional interactome: gene expression in 3D. *Curr Opin Genet Dev*, 20, 127-133.

Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., Eskiw, C.H., Luo, Y., Wei, C.L., Ruan, Y., Bieker, J.J. and Fraser, P. (2010b) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, 42, 53-61.

Schwarze, S.R., Hruska, K.A. and Dowdy, S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*, 10, 290-295.

Shannon-Lowe, C. and Rowe, M. Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog*, 7, e1001338.

Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B. and Delecluse, H.J. (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7065-7070.

Sharma, V., Knobloch, T.J. and Benjamin, D. (1995) Differential expression of cytokine genes in HIV-1 tat transfected T and B cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 208, 704-713.

Sharp, P.A. and Marciniak, R.A. (1989) HIV TAR: an RNA enhancer? *Cell*, 59, 229-230.

Shen, X. and Tomaras, G.D. (2010) Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr HIV/AIDS Rep*, 8, 23-30.

Sheng, W., Decaussin, G., Ligout, A., Takada, K. and Ooka, T. (2003) Malignant transformation of Epstein-Barr virus-negative Akata cells by introduction of the BARF1 gene carried by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 77, 3859-3865.

Shimizu, N., Yoshiyama, H. and Takada, K. (1996) Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *J Virol*, 70, 7260-7263.

Shin, C.G., An, D.G., Song, H.H. and Lee, C. (2009) Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *J Antibiot (Tokyo)*, 62, 687-690.

Sixbey, J.W. and Yao, Q.Y. (1992) Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*, 255, 1578-1580.

Skalnikova, M., Kozubek, S., Lukasova, E., Bartova, E., Jirsova, P., Cafourkova, A., Koutna, I. and Kozubek, M. (2000) Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation. *Chromosome Res*, 8, 487-499.

Smider, V., Rathmell, W.K., Lieber, M.R. and Chu, G. (1994) Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science*, 266, 288-291.

Solovei, I. and Cremer, M. (2010) 3D-FISH on cultured cells combined with immunostaining. *Methods Mol Biol*, 659, 117-126.

Solovei, I., Schermelleh, L., During, K., Engelhardt, A., Stein, S., Cremer, C. and Cremer, T. (2004) Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma*, 112, 410-423.

Sonoki, T., Willis, T.G., Oscier, D.G., Karran, E.L., Siebert, R. and Dyer, M.J. (2004) Rapid amplification of immunoglobulin heavy chain switch (IGHS) translocation breakpoints using long-distance inverse PCR. *Leukemia*, 18, 2026-2031.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P. and de Villartay, J.P. (2007) V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*, 26, 7780-7791.

Southgate, C.D. and Green, M.R. (1991) The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. *Genes Dev*, 5, 2496-2507.

Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G. and Misteli, T. (2007) Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 9, 675-682.

Speck, P., Haan, K.M. and Longnecker, R. (2000) Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology*, 277, 1-5.

Speck, P. and Longnecker, R. (2000) Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1849-1851.

Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*, 114, 2891-2893.

Stettner, M.R., Nance, J.A., Wright, C.A., Kinoshita, Y., Kim, W.K., Morgello, S., Rappaport, J., Khalili, K., Gordon, J. and Johnson, E.M. (2009) SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*, 90, 2005-2014.

Steven, N.M. (1997) Epstein-Barr virus latent infection in vivo. *Rev Med Virol*, 7, 97-106.

Sun, Y., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Wang, H.P., Bai, B., Sui, J.L. and Zhou, P.K. (2006) HIV-1 Tat depresses DNA-PK(CS) expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65, 842-850.

Sutherland, H. and Bickmore, W.A. (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nat Rev Genet*, 10, 457-466.

Swingler, S., Zhou, J., Swingler, C., Dauphin, A., Greenough, T., Jolicoeur, P. and Stevenson, M. (2008) Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe*, 4, 63-76.

Taccioli, G.E. and Alt, F.W. (1995) Potential targets for autosomal SCID mutations. *Curr Opin Immunol*, 7, 436-440.

Tanabe, H., Habermann, F.A., Solovei, I., Cremer, M. and Cremer, T. (2002) Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res*, 504, 37-45.

Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. and Kieff, E. (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, 50, 203-213.

Titanji, K., Chiodi, F., Bellocco, R., Schepis, D., Osorio, L., Tassandin, C., Tambussi, G., Grutzmeier, S., Lopalco, L. and De Milito, A. (2005) Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *Aids*, 19, 1947-1955.

Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, 67, 2014-2025.

Turner, A.R., MacDonald, R.N. and Cooper, B.A. (1972) Transmission of infectious mononucleosis by transfusion of pre-illness plasma. *Ann Intern Med*, 77, 751-753.

Turner, M.W. (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology*, 199, 327-339.

Turpin, J.A. (2003) The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental antiHIV drugs and targets. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1, 97-128.

Valerie, K. and Povirk, L.F. (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 22, 5792-5812.

van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2, 196-206.

Varga-Weisz, P.D. and Becker, P.B. (2006) Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 151-156.

Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P. and Beaumelle, B. (2004) HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell*, 15, 2347-2360.

Verdone, L., Caserta, M. and Di Mauro, E. (2005) Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol*, 83, 344-353.

Vilenchik, M.M. and Knudson, A.G. (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12871-12876.

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

Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272, 16010-16017.

Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412, 607-614.

Weber, J. (2001) The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull*, 58, 61-72.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. and Jones, K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92, 451-462.

Westendorp, M.O., Li-Weber, M., Frank, R.W. and Krammer, P.H. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J Virol*, 68, 4177-4185.

Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Droge, W. and Lehmann, V. (1995) HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo J*, 14, 546-554.

Weterings, E. and Chen, D.J. (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*, 18, 114-124.

Williams, R.R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (2006) Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci*, 119, 132-140.

Willis, T.G., Jadayel, D.M., Coignet, L.J., Abdul-Rauf, M., Treleaven, J.G., Catovsky, D. and Dyer, M.J. (1997) Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood*, 90, 2456-2464.

Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N. and Takada, K. (1997) Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol*, 71, 5688-5691.

Zeitz, M.J., Mukherjee, L., Bhattacharya, S., Xu, J. and Berezney, R. (2009) A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *J Cell Physiol*, 221, 120-129.

Zheng, L., Yang, Y.D., Lu, G.C. and Salvato, M.S. (2005) Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6, 668-672.

Zhou, Q., Chen, D., Pierstorff, E. and Luo, K. (1998) Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *Embo J*, 17, 3681-3691.

Ziegler, J.L., Bragg, K., Abrams, D., Beckstead, J., Cogan, M., Volberding, P., Baer, D., Wilkinson, L., Rosenbaum, E., Grant, K. and et *al*. (1984) High-grade non-Hodgkin's lymphoma in patients with AIDS. *Ann N Y Acad Sci*, 437, 412-419.

Zink, D., Amaral, M.D., Englmann, A., Lang, S., Clarke, L.A., Rudolph, C., Alt, F., Luther, K., Braz, C., Sadoni, N., Rosenecker, J. and Schindelhauer, D. (2004) Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol*, 166, 815-825.

Zink, D. and Cremer, T. (1998) Cell nucleus: chromosome dynamics in nuclei of living cells. *Curr Biol*, 8, R321-324.

Zocchi, M.R., Poggi, A. and Rubartelli, A. (1997) The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells. *Aids*, 11, 1227-1235.

Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T. and Zimmer, J. (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res*, 124, 111-119.

REMANIEMENT NUCLEAIRE DANS LES LYMPHOCYTES B PROVOQUE PAR LES VIRUS EBV ET VIH-1

Le lymphome de Burkitt (BL) est due dans 80% des cas à une translocation chromosomique t(8;14) (q24;q32). Cette translocation marque l'évenement initial de la transformation maligne d'une cellule B normale, par délocalisation de l'oncogène *CMYC* à proximité du locus du gène codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline *IGH* par le mécanisme de réparation de l'ADN NHEJ durant l'hypermutation somatique (SMH). La probabilité de cette translocation est inversement proportionnelle à la distance qui sépare les loci portés par les deux chromosomes. La tanslocation t(8;14) (q24;q32) qui apparaît durant les étapes de différentiation des lymphocytes B est encore plus importante chez les patients infectés par le virus Epstein-Barr (EBV) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1).
L'objectif de notre étude, est de détérminer les origines possibles de la translocation t(8;14) (q24;q32) dans les lymphocytes B normaux humains. Nous nous sommes intéressés tout d'abord à la dynamique de la localisation nucléaire des loci *IGH* et *CMYC* dans les lymphocytes B activés. Nous avons particulièrement étudié l'impact des virus EBV et VIH-1 sur l'organisation des gènes *IGH* et *CMYC*. Nous avons utilisé la technique d'hybridation in situ à fluorescence FISH pour la détection de *CMYC* (8q24) et *IGH* (14q32). Dans les lymphocytes B naïfs, *CMYC* est localisé du côté de la periphérie nucléaire, en revanche *IGH* est central, les deux loci sont complétement distants dans le noyau. L'activation des lymphocytes B induisait une augmentation de la colocalisation *IGH-CMYC*. La proximité physique entre les deux loci augmente la probabilité de leur translocation durant la SHM et favorise la t(8;14) (q24;q32) dans les lymphocytes B. Nous avons montré que les virus EBV et VIH-1 ont un effet important sur la délocalisation *IGH-CMYC* dans les lymphocytes B. Nous avons aussi déterminé une molécule virale VIH-1 qui intervenait aussi dans la dérégulation de la localisation nucléaire des gènes *IGH* et *CMYC*. Nous avons déterminé deux mécanismes différents et indépendants impliqués dans la dynamique des loci *IGH* et *CMYC* : le premier mécanisme intervient dans le processus de développement normal des lymphocytes B, et le deuxieme mécanisme dépend des virus ainsi que des molécules virales (particulièrement la Tat-HIV-1).

NUCLEAR REORGANIZATION IN B LYMPHOCYTES PROVOKED BY EBV AND HIV 1 VIRUS

Eighty percent of Burkitt's lymphomas (BL) cases bear translocation t(8;14)(q24;q32). This translocation is the initial event in malignant transformation of normal B-cell and derives from non-homologous end joining of the oncogene *CMYC* to the immunoglobulin heavy chain locus *IGH* during Somatic Hypermutation (SHM) of *IGH*. The probability of this translocation is inversely proportional to the distance between the loci of involved chromosomes. The translocation t(8;14)(q24;q32) occurs during normal development of B-lymphocytes and more probable in patients infected with Epstein-Barr virus (EBV) and the human immunodeficiency virus (HIV-1).
The subject of this study was to determine the possible origin of the translocation t(8;14)(q24;q32) in human normal B-lymphocytes. We followed the dynamics of the nuclear localization of *IGH* and *CMYC* genes in activated B-lymphocytes. We payed particular attention to the impact of EBV and HIV-1 viruses on dynamics of both *IGH* and *CMYC*. We applied Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of *CMYC* (8q24) and *IGH* (14q32). In naïve B-cells *CMYC* is mainly localized in the periphery of nucleus, whereas *IGH* is preferentially localized in the nuclear centre, i.e. these loci are distanced by a radius of cell nucleus. Activated B-lymphocytes displayed dramatic increase of number of cells with colocalized *IGH* and *CMYC*. Close physical proximity of *CMYC* to *IGH* during SHM amplifies the probability of occurance of translocation t(8;14)(q24;q32) in human B-lymphocytes. Interestingly, we observed even more pronounced impact of EBVand HIV-1on proximity of *IGH* and *CMYC*. Finaly, among the molecules of HIV-1 we revealed those which possess the most regulative role on dynamics of both *IGH* and *CMYC*. Our results suggest about two independent mechanisms of *IGH* and *CMYC* dynamics: the first is appropriate for normal development of B-lymphocytes and the second depends on virus and viral molecules, such as transactivator of viral transcription HIV Tat.