



Université de Limoges

École Doctorale Biologie-Santé (ED615)

**UMR CNRS 7276-INSERM U1262- Contrôle de la Réponse Immune B et des
Lymphoproliférations**

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

Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par

Catherine Ouk

Le 2 février 2022

**Apport de la modélisation de la transformation du
Lymphocyte B par Myd88 dans la compréhension de
la Maladie de Waldenström.**

Thèse dirigée par

le Professeur **Jean FEUILLARD** et le Docteur **Christelle VINCENT-FABERT**

Jury de thèse:

Président : Pr Danielle Troutaud (PR, UMR7276-INSERM U1262, Limoges)

Rapporteurs : Pr Véronique leBlond (PU-PH, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris)
Dr Laurent Genestier (CR, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Lyon)

Examineurs : Dr Marion Espeli (CR, INSERM U1160, Paris)

Invités : Dr Julie Abraham (PH, CHU-Limoges, Limoges)

*« Le premier ennemi de la connaissance n'est pas l'ignorance.
C'est l'illusion de la connaissance »*

Stephen Hawking

Dans la vie et plus particulièrement en recherche,

*« La connaissance, c'est d'avoir la bonne réponse.
L'intelligence, c'est d'avoir la bonne question. »*

Proverbe Chinois

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette
thèse ...



A Tan, puisses-tu m'aimer pour toujours.

A mes enfants, Emma et Sarah, puissiez-vous toujours donner les moyens de vos ambitions, quelles qu'elles soient.

A mes parents que j'aime très fort.

Remerciements

Je commencerai par remercier le professeur Michel Cogné de m'avoir accueilli il y a plus maintenant un peu plus de 10 ans au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour votre soutien lors des demandes de poste NOEMIE.

Un grand merci à Jean Feuillard de m'avoir accordé ma chance il y a très exactement 15 ans. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir encouragé et soutenu lors de mon oral pour le poste d'Ingénieur d'Étude. Encore merci à vous de m'avoir transmis l'amour de la recherche et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de votre équipe et de m'avoir soutenue une fois de plus pendant mon année de convalescence.

Un énorme merci à mon amie Chantal Jayat-Vignoles qui m'a formé au travail d'ingénieur de plateforme en cytométrie. Je te remercie pour tes conseils, pour nos discussions sur les petits enfants, la famille, nos fous rires ainsi que ta grande gentillesse.

Un grand merci aussi à Christelle Vincent-Fabert d'avoir accepté de m'encadrer pendant un peu plus de 5 ans sur ce sujet de thèse. Merci pour ta confiance, ton aide, et sur tous tes conseils pendant la rédaction du mémoire.

Merci aux membres du jury, Véronique LeBlond et Laurent Genestier, d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci à Marion Espeli et Julie Abraham d'avoir accepté d'être examinateurs et merci à Danielle Troutaud d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Merci à Claire de m'avoir secondé durant toute mon absence pour raisons médicales ainsi que pour ta patience.

Merci à tous les doctorants avec qui j'ai pu travailler de façon plus étroite, Mona, Pauline, Héloïse, Lilian et Quentin. Merci pour les bons moments au labo, où vous avez apporté gaieté et légèreté.

Merci à mon ancien collègue de bureau Oussama, pour ta grande sagesse lors de ses discussions pertinentes tant sur la vie au laboratoire que sur l'éducation des enfants et le jardinage.

Merci à tous les membres de l'équipe de Jean Feuillard pour leur bien vaillance pendant l'écriture de ma thèse. Merci à Éric et Yves pour leurs discussions et conseils avisés en tout genre.

Merci à, Robin, Sophie, Nathalie, Christelle O, Stéphanie, ainsi qu'à tous les autres membres des deux équipes de l'UMR CNRS 7276 / INSERM1262 pour leur bonne humeur et nos discussions dans les couloirs. Merci pour ces moments partagés ensemble pendant les repas de Noël par exemple.

Enfin, je tiens à remercier les personnes qui m'entourent au quotidien et qui m'ont toujours soutenue. Papa, maman, vous m'avez toujours encouragé et donné le meilleur, je vous dois tout. Cette thèse est aussi une façon de vous dire à quel point je vous suis reconnaissante. Je vous aime très fort !

Tan, mon amour, mon âme sœur, merci d'être dans ma vie, d'autant me soutenir et de m'encourager surtout après la maladie. Merci de m'avoir donné deux belles petites filles qui me donnent la force de me battre au quotidien. J'ai de la chance de vous avoir. Je vous souhaite que la vie soit et reste douce encore longtemps.

Table des matières

Chapitre 1 : réponse Immunitaire : Généralités	3
1.1. L'immunité naturelle (innée) et l'immunité adaptative	4
1.1.1. <i>L'immunité naturelle (innée)</i>	4
1.1.1.1. <i>les PAMPs et les PRRS</i>	4
1.1.1.2. <i>La phagocytose et la réaction inflammatoire</i>	5
1.1.2. L'immunité adaptative à médiation cellulaire.....	6
Chapitre 2 : Les TLRs et MYD88	7
2.1. Structure des TLRs	8
2.1.1. Les protéines adaptatrices des TLRs	9
2.1.2. Structure de la protéine MYD88	10
2.2. Signalisation TLRs MYD88 dépendantes.....	11
2.2.1. Myddosome.....	12
2.2.2. Les complexes TRIKA.....	13
2.2.3. Les facteurs IRFs	14
2.2.3.1. IRF 7	14
2.2.3.2. IRF1 et IRF5	15
2.2.4. Le facteur de transcription AP-1 avec la voie MAP Kinases	16
2.2.5. Le facteur de transcription NF- κ B	17
2.2.6. Régulation de la signalisation TLRs MYD88 dépendante : IRAK-M	18
2.3. Signalisation TLRs MYD88 indépendantes	19
Chapitre 3 : NF-κB	20
3.1. Les différents régulateurs de NF-κB	20
3.1.1. <i>La famille de protéines kinases IKK</i>	20
3.1.2. <i>Les sous-unités de NF- κB</i>	21
3.1.3. <i>La famille des protéines IκB</i>	23
3.2. La voie « classique » NF- κB et le myddosome	25
3.3. La voie « alternative » NF- κB.....	28
Chapitre 4 : MYD88 et cancer	31
4.1. Effet anti-tumoral de MYD88	32
4.2. Effet pro-tumoral de MYD88	33
4.3. Rôle ambivalent de MYD88 : cas particulier du cancer du côlon	34
4.4. Étude de l'impact de la surexpression de MYD88.....	36
4.5 : Étude de l'impact des mutations somatiques du gène MYD88 dans les cancers	37
4.5.1. Localisation des mutations MYD88.....	37
4.5.2. Variant L265P.....	38
4.5.3. Autres mutations	39
4.5.4. L'impact de la présence de mutations somatiques MYD88 dans les cancers et dans la surveillance immune ..40	
Chapitre 5 : les lymphomes non Hodgkiniens à cellules B présentant la mutation MYD88 L265P	42
5.1. Présentation générale sur les lymphomes	42
5.2. Le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé	43
5.3. Maladie de Waldenström	46
5.3.1. Épidémiologie	46
5.3.2. Diagnostic	47
5.3.3. Classification	50
5.3.4. Étiologie et physiologie	52
5.3.5. Les mutations autres que L265P dans la MW	56
5.3.6. Pronostic et traitement	58

Chapitre 6 : Étude de l'impact de l'expression de la mutation L265P au travers de modèle murin.....	61
Revue des modèles publiés	62
Objectifs.....	65
RESULTATS	66
7.1. Étude du rôle de la mutation murine MYD88 L252P au travers de la création d'un modèle <i>in vivo</i> original .	67
7.1.1. Article.....	69
7.2. Étude de l'expression de la mutation humaine MYD88 L265P dans un modèle <i>in vitro</i> original	70
7.2.1. Matériel utilisé pour l'étude.....	71
7.2.1.1. Lignée cellulaire EREB2.5	71
7.2.1.2. Vecteur épisomique inductible	72
7.2.2. Résultats non publiés.....	73
7.2.2.1. Validation du modèle cellulaire	74
7.2.2.1.1. Vérification de la lignée cellulaire EREB2.5	74
7.2.2.1.2. Validation des différentes constructions dans la lignée cellulaire EREB2.5	75
7.2.2.2. Étude de l'impact de l'expression de MYD88 L265P sur la voie NFκB	77
7.2.2.3. Transcriptome EREB à comparer avec les patients.....	78
7.2.2.4. Immunophénotypage B des EREB2.5 exprimant la mutation MYD88L265P	80
7.2.2.5. Étude de l'effet de la mutation L265P sur le niveau d'expression des interleukines IL10-TGFβ-IL35	82
Discussion et perspectives	84

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma d'évolution des systèmes immunitaires.....	3
Figure 2 : Les différents TLR et leurs ligands.....	7
Figure 3 : Structures des TLR et IL-1R.....	8
Figure 4 : Les TLRs et leurs molécules adaptatrices.....	9
Figure 5 : Structure de MYD88.....	10
Figure 6 : Fonction de MYD88.....	11
Figure 7 : Le myddosome.....	12
Figure 8 : Complexe TRIKA.....	13
Figure 9 : Voie de signalisation via les TLR7 et 9 aboutissant à l'activation de facteur de transcription IRF-7.....	14
Figure 10 : Signalisation TLRs activant les facteurs de transcription IRF-1 et IRF-5.....	15
Figure 11 : Signalisation TLRs activant le facteur de transcription AP-1.....	16
Figure 12 A : Activation de la voie de signalisation MYD88 TLR dépendante.....	18
Figure 12 B : Inhibition de la voie de signalisation MYD88 TLR dépendante.....	18
Figure 13 : Exemple d'une voie de signalisation indépendante de MYD88 via l'activation du TLR3.....	19
Figure 14 : Famille des IKKs.....	20
Figure 15 : Famille des NF- κ B/Rel.....	21
Figure 16 : Famille des protéines I κ B.....	22
Figure 17 : Représentation schématique de la voie classique NF- κ B médiée par MYD88.....	24
Figure 18 : Voie de signalisation NF κ B médiée par Btk.....	26
Figure 19 A : Signalisation de la voie alternative lorsque la cellule est au repos.....	28
Figure 19 B : Signalisation de la voie alternative lorsque la cellule est activée.....	29
Figure 20 : Rôles divergents de MYD88 dans la cancérogenèse.....	30
Figure 21 : Distribution des variants sur la séquence protéique MYD88 humaine.....	37
Figure 22 : Diagramme de fréquence d'apparition de la mutation MYD88 ^{L265P} dans différents lymphomes d'origine B.....	38
Figure 23 : Schéma montrant les mutations MYD88 caractérisées dans les lymphomes non hodgkiniens B.....	39
Figure 24 : Voies oncogéniques présentes dans les deux sous-types de lymphome diffus à grandes cellules B.....	44
Figure 25 : Infiltration lymphoplasmocytaire.....	48
Figure 26 : Origine des lymphoplasmocytes de la MW.....	53
Figure 27 : Mise en évidence de deux sous-types MW.....	54
Figure 28 : Résumé des résultats du génome et du transcriptome dans MW.....	57
Figure 29 : Séquence <i>MYD88</i> humaine et murine.....	61
Figure 30 : Recombinaison homologue du transgène <i>Myd88</i> L252P-Yfp au niveau du locus <i>Rosa26</i>	67
Figure 31 : Modèle murin <i>Myd88</i> L252P.....	67
Figure 32 : Représentation schématique de l'obtention de la lignée EREB2.5.....	71
Figure 33 : Schémas du vecteur d'expression <i>Prt1-MYD88</i> WT ou L265P.....	72
Figure 34 : Représentation schématique de l'activation de la voie NF- κ B en présence ou en absence œstradiol.....	73
Figure 35 : Vérification de la potentialité de privation des EREB2.5.....	74
Figure 36 : Vérification de l'efficacité et potentialité de privation des EREB2.5 transfectées.....	75

Figure 37 : Étude du profil d'expression de MYD88 par qPCR après privation en œstradiol à la doxycycline	76
Figure 38 : Vérification de l'expression de MYD88 dans les EREB2.5 transfectées	76
Figure 39 : Étude du profil d'expression de A20 et TRAF1 après privation et activation à la doxycycline	77
Figure 40 : Analyse transcriptomique des EREB exprimant la mutation <i>MYD88</i> L265P	78
Figure 41 Mise en évidence d'une signature immune liée à l'expression de la mutation <i>MYD88</i> ^{L265P} dans les EREB2.5	79
Figure 42 : Mise en évidence de l'effet de la mutation <i>MYD88</i> sur le profil B régulateur des EREB2.5	81
Figure 43 : Etude de l'effet de la mutation L265P sur le niveau d'expression des interleukines IL10-TGFβ-IL35	83

Lexique

A

AACR GENIE : « American Association for Cancer Research », registre international du cancer accessible au public

Ac : anticorps

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

Ag : antigènes

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMP : AntiMicrobial Peptide (peptides antimicrobiens)

ANK : Répétitions ankyrines

AOM : Azoxyméthane

AP : « Activating Protein-1 », protéine activatrice 1

APRIL : « A Proliferation Inducing Ligand ligand », inducteur de prolifération

ARN : Acide Ribo Nucléique

ARNdb : ARN double brin

B

BAFF: « B cell-activating factor belonging to the TNF family », Facteur d'activation des cellules B appartenant à la famille TNF

Bcl3: « B-cell lymphoma 3», Lymphome à cellule B3

BCR: « B Cell Receptor», Récepteur de cellule B

BDR : Bortézomib, combiné avec la Dexaméthasone et le Rituximab

Benda-R : Bendamustine combiné au Rituximab

Breg : B régulateurs

BTK: Bruton Tyrosine Kinase

C

CAC : Cancer Associé à la Colite

CaRD : Carfilzomib, Rituximab et Dexaméthasone

CD : Cellules Dendritiques

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène

CRP : « C réactive Protein », Protéine C-Réactive

CU : Colite Ulcéreuse ou Rectocolite hémorragique/RCH

CXCR4 : « C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 », Récepteur de chimiokines Motif C-X-C 4

D

DC-SIGN : « *DC-spécifique intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin* », Récepteurs aux lectines de type C

DD : « Death Domain », Domaine de mort

DEN : Diéthylnitrosamine

DLBCL : Lymphomes Diffus à grandes Cellules B

DSS : Dextrane sulfate de sodium

E

EBV : *Epstein-Barr virus*

ERK : « *Extracellular signal-regulated kinases* », kinases régulées par le signal extracellulaire

ern1 : « *Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1* », signalization du reticulum endoplasmique au noyau

ETS1 : « *Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1* », Homologie du virus E26 de l'érythroblastose aviaire

F

FLI1 : « *Friend leukemia integration 1 transcription factor* », facteur de transcription d'intégration de la leucémie

G

GC-like : « Germinal Center », centre germinatif

GRR : « Glycin-Rich Region », région riche en glycine

H

HCC : carcinome hépatocellulaire

HLH : domaine hélice-boucle-hélice en position carboxy-terminal

HMGB1 : « high mobility group box 1 », groupe de boîte à haute mobilité

HTLV1 : « *human T lymphotropic virus* », virus lymphotrope T humain

I

IDR : Ixazomib, Dexaméthasone et Rituximab

IFN :interférons

Ig : Immunoglobulines

IKK : IκB kinase

IL : Interleukine

IL-1R : Interleukine recepteur 1

IRAK : «Interleukin 1 Receptor Associated Kinase », Kinase associée au récepteur d'interleukine

IRF : « Interferon Regulatory transcription Factor », facteur de transcription régulateur de l'interféron

J

JAK: «Janus Kinase »

JNK: c-Jun N-terminal kinase

K

K48: Lysine 48

K63: Lysine 63

L

LB : Lymphocytes B

LL : Lymphome lymphocytaire

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMP1 : « Latent Membrane Protein-1 », protéine membranaire de latence-1

LNH : Lymphome non Hodgkiniens

LNHB : Lymphome non Hodgkiniens B

LNHT : Lymphome non Hodgkiniens T

LPL : Lymphome lymphoplasmocytaire

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : « Leucine-Rich Region », Régions riches en leucine

LT : Lymphocytes T

LZ : « Leucine Zipper », Motif de fermeture éclair à leucine

LZM : Lymphome de la zone marginale

M

MAL : « MYD88 adapter-like protein », protéine adaptatrice MYD88

MALT : « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue », tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MAMP : Motifs de peptides antimicrobiens

MAP3K14 : « Mitogen-Activated Protein Kinase », protéine kinase active par les mitogènes

MBC : « Memory B Cells », Cellules B mémoire

MC : Maladie de Crohn

MCA : Méthyl-Chol-Anthrène

MCL : « Mantle Cell Lymphoma », cellules du manteau

MDSC : Cellules Suppressives Dérivées des Myéloïdes

MGUS : Gammapathie Monoclonale de Signification Indéterminée

MII : Maladie Inflammatoire de l'Intestin

MW : Macroglobulinémie de Waldenström

N

NAP1 : « Nucleosome Assembly Protein 1-like », protéine d'assemblage du nucleosome 1-like

NBD : Domaine de liaison NEMO

NEMO : NF- κ B Essential Modulator

NES : « Nuclear Export Sequence », Séquence d'Exportation Nucléaire

NF- κ B : « Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells »

NIK : «NF-kappa-B-inducing *kinase*»

NK : « *Natural Killer* », *cellules tueuses*

NOD : « Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins », *protéine du domaine d'oligomérisation se liant aux nucléotides*

O

ODN-CpG : CpG oligodeoxynucleotide

P

PAMPs : « Pathogen Associated Molecular Patterns », patterns de peptides antimicrobiens

PC : Cellules Plasmocytaires

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PRRs : « Pattern Recognition Receptor », récepteurs de reconnaissance de motifs

PTEN : Phosphatase Tensine

PTX3 : Molécule pentraxin3

R

R-CHOP: cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone plus rituximab

Rel : « Rel Homology Domain »

RHD : Rel N-terminal

RHD : Domaine d'Homologie à Rel

RHIM : « Receptor-interacting protein Homotypic Interaction Motif », protéine interagissant avec les récepteurs de motif d'interaction homotypique

RIP1: « Receptor-Interacting Protein », récepteur d'interaction protéique

S

SAP: Serum Amyloid P

SAPK : Stress-Activated Protein Kinases

SCF κ : « Skp1, Cdc53/Cullin1, and F-box protein β I κ B », Complexe ligase I κ

SI : Système Immunitaire

STAT3: « Signal Transducer and Activator of Transcription 3 »

SWM: « Smolding Macroglobulinémies de Waldenström »

T

TAD : domaine C-terminal d'activation de la transcription

TAK : TGF β -activated kinase 1

TAM : « Tumor-Associated Macrophages », Macrophages Associés aux Tumeurs

TBK1: TANK-binding kinase 1

TCR: T Cell Receptor

TICAM: « *Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1* »

TIL : Lymphocytes Infiltrant la Tumeur

TIR : Domaine (Toll/IL-1R/R).

TIRAP : Toll/IL-1 receptor adapter protein»

TLR: Récepteurs Toll-like

TNF- α : « *Tumor Necrosis Factor- α* », *Facteur de nécrose tumorale*

TRAF: « Tumor-necrosis Factor Receptor-Associated Factor », *Facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale*

TRAM: « TRIF-related adaptor molecule », *Molécule adaptatrice liée à TRIF*

Treg : T régulateur

TREM-1: « Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 », *récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes*

TRIF: « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β », *interféron induisant un adaptateur contenant le domaine TIR*

U

UBC13: « Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2N », *enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2N*

Uev1A: « Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1 », *enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 V1*

UV : Ultra-Violet

x

xbp1: « X-Box Binding Protein 1 », *protéine de liaison x-box*

Z

ZMS: lymphome de la zone marginale splénique

Avant-propos

Les cancers constituent un groupe de pathologies très hétérogènes, que ce soit au niveau de la genèse de la maladie, la prise en charge, la morbidité ou même du taux de guérison. Selon les dernières estimations publiées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), 18,1 millions de nouveaux cas de cancer auraient été diagnostiqués dans le monde en 2018 et 9,6 millions de personnes sont décédées d'un cancer. L'Institut National du Cancer (INCa) estime qu'un peu plus de 3,8 millions de cas de cancer sont diagnostiqués en France aujourd'hui. Ce nombre de cas de cancer n'a cessé d'augmenter avec les années au point de devenir en 2013 la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de Décès, CépiDc, 2021). Le cancer du sein et le cancer de la prostate sont les cancers qui rencontrent la plus forte progression avec respectivement, 31% de nouveaux cas chez les femmes et 28% de nouveaux cas chez les hommes. Apparaissent ensuite, les cancers du poumon où l'on rencontre une progression de 14 % chez les hommes et 7 % chez les femmes, suit derrière le cancer du côlon rectum pour lequel on observe une progression de 12 %. Pour finir, nous avons les hémopathies malignes, qui représentent 10 % des nouveaux cas de cancer dont 55% chez l'homme et 45% chez la femme. Chaque année, en France, ces hémopathies malignes touchent plus de 33 000 personnes. Il existe 137 types d'hémopathies malignes et d'affections connexes. Chez l'adulte les plus fréquentes sont la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la leucémie aigüe myéloblastique (LAM), le lymphome hodgkinien, le lymphome non hodgkinien et le myélome. Parmi les lymphomes non hodgkiniens on retrouve des formes malignes à évolution très lente, elles sont définies comme indolentes. Parmi ceux-ci, on trouve le lymphome folliculaire, la LLC, les lymphomes de la zone marginale, le lymphome lymphoplasmocytaire ou Macroglobulinémie de Waldenström (MW). D'autres sont dites agressives et englobent notamment, le lymphome B diffus à grandes cellules, le lymphome de Burkitt. Même s'il est possible de diagnostiquer ces lymphomes chez les jeunes, la grande majorité des patients sont des personnes de plus de 65 ans. Cependant, même si le nombre de patients ne cesse d'augmenter depuis plus d'une trentaine d'années, *a contrario*, le taux de mortalité diminue depuis le début des années 1990. Ceci est en rapport avec l'amélioration des méthodes de dépistage et de diagnostic, qui permettent de déceler les cancers à un stade plus précoce et à l'avancée des recherches en terme de traitements.

Le gouvernement a souhaité renforcer la lutte contre les cancers en France en ciblant la prévention, la prise en charge ou l'accompagnement des patients. C'est pourquoi depuis 2003, un plan de lutte contre les cancers a été mis en place. Ce plan a pour objectif de réduire de 60 000 cas par an le nombre de cancers évitables à l'horizon 2040, de dépister un million de personnes en plus par an à partir de 2025, de réduire de deux tiers à un tiers la part des patients souffrant de séquelles 5 ans après un diagnostic, et d'infléchir significativement le rythme de progression du taux de survie des cancers de plus mauvais pronostic, à l'horizon 2030 (<https://solidarites-sante.gouv.fr/>). Afin de renforcer la lutte contre le cancer, plusieurs

stratégies sont en cours de développement. Ces dernières consistent à améliorer la prévention, primaire comme secondaire, à limiter les séquelles et améliorer la qualité de vie des patients, à lutter contre les cancers de mauvais pronostic chez l'adulte et chez l'enfant, et s'assurer que les progrès en matière de lutte contre les cancers bénéficient à tous.

Il est nécessaire de développer des thérapies plus efficaces et plus ciblées afin de réduire les effets secondaires, prévenir les risques de rechutes ainsi que d'éventuelles résistances aux traitements. Il est également important de connaître l'origine d'un cancer, ses causes et ses conséquences sur l'organisme. Cela ne peut être fait que par établissement d'études cliniques et précliniques. Cela nécessite obligatoirement l'utilisation de méthodes *in vitro* (modèles cellulaires) ou *in silico* (modélisation informatique), méthodes indispensables pour la compréhension de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Cependant, l'utilisation de modèles animaux est essentielle pour étudier l'organisme dans son intégralité et reproduire les multiples interactions créées au sein d'un organisme tout entier.

Mon travail a porté sur l'établissement et la création d'un modèle murin reproduisant la MW. La MW est un lymphome indolent incurable associé à la présence d'une mutation L265P au niveau du gène *MYD88*. Mon introduction bibliographique portera sur l'étude des voies de signalisation TLR dépendantes de *MYD88* ou non, impliquées dans la réponse immune innée. Ensuite je présenterai le potentiel rôle oncogénique de la protéine *MYD88* dans les cancers avec une présentation détaillée des différents lymphomes pour lesquels une mutation de *MYD88* est connue. Enfin, la partie introductive se terminera par une description et une analyse critique des modèles *in vitro* et *in vivo* avec expression de *MYD88* mutée publiés au cours de ma thèse. La partie Résultats est divisée en 2 parties. La première partie concerne la caractérisation d'un nouveau modèle *in vivo* d'expression de la mutation *Myd88* L252P. Il a fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Frontiers in Immunology* dans lequel je suis co-1^{ère} auteure [1]. Pour la 1^{ère} fois, nous montrons que l'activation continue de *MYD88* est suffisante pour induire un LPL ressemblant à la MW. La 2^{ème} partie de mes résultats porte sur la création d'un modèle *in vitro* d'expression de la mutation humaine *MYD88* L265P et fait l'objet d'un article scientifique en cours d'écriture. Dans cet article, nous étudions l'impact de la mutation *MYD88* L265P sur les cellules B de l'EBV en quiescence. L'objectif est de mieux comprendre les changements aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau fonctionnel qu'engendre directement la mutation *MYD88* L265P. Cela permettra de mieux comprendre comment *MYD88* contribue à l'émergence de la MW. L'ensemble de ces résultats feront l'objet d'une discussion spécifique qui permettra d'aborder les perspectives possibles à l'ensemble de ce travail.

Chapitre 1 : Réponse Immunitaire : Généralités

Le **système immunitaire (SI)** est un mécanisme de défense utilisé par les organismes multicellulaires. Il vise à protéger l'organisme contre ce qui lui est étranger (le non-soi) et de tolérer ce qui lui est propre (le soi). Parmi les agents pathogènes, on retrouve les bactéries, les virus et les parasites. Le SI est composé d'un ensemble d'organes, tissus, cellules et molécules qui contribuent au maintien de l'intégrité de l'organisme.

Ces mécanismes sont devenus de plus en plus complexes au fur et à mesure de l'évolution des espèces afin de combattre des agents pathogènes en constante évolution. Tous les organismes pluricellulaires possèdent un système immunitaire plus ou moins développé. Selon les organismes, il existe deux types de réponse immunitaire : l'immunité innée (ou naturelle) et l'immunité adaptative (ou à médiation cellulaire) (cf. **Figure 1**). [2]

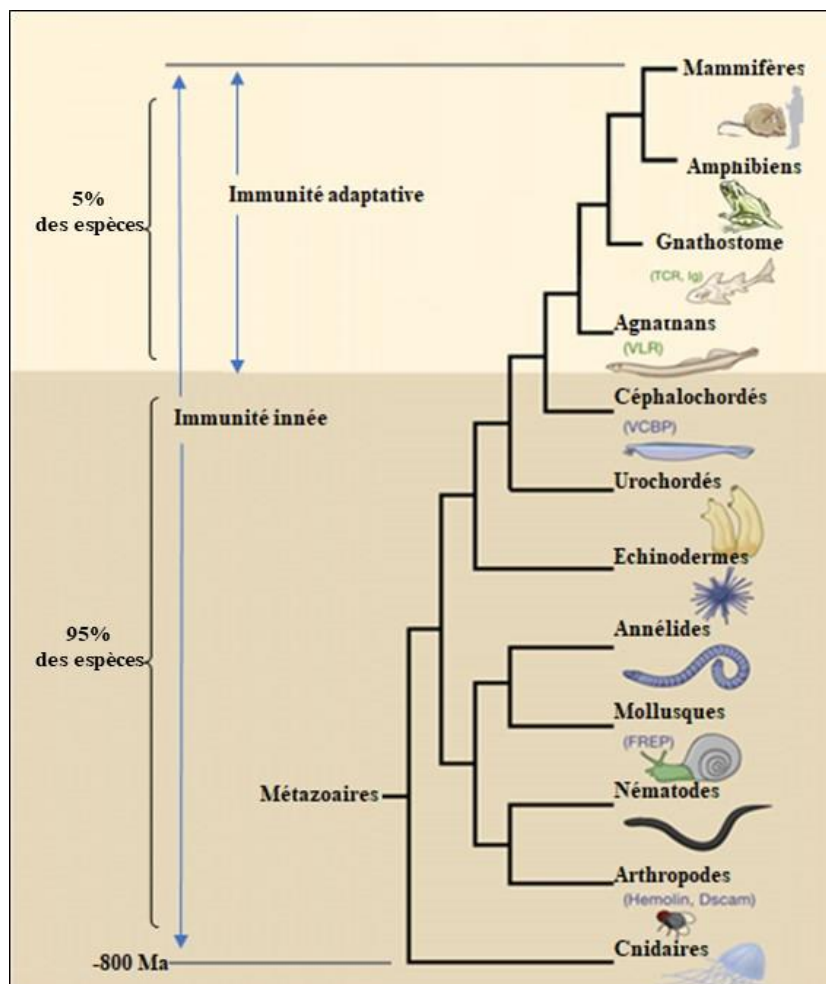


Figure 1 : Schéma d'évolution des systèmes immunitaires

À ce jour, il existe environ 2 millions d'organismes pluricellulaires faisant appel à la réponse immunitaire innée pour combattre les infections par les micro-organismes. En revanche seule, 45 000 espèces vertébrées font appel à la réponse immunitaire innée et adaptative. D'après Cooper et al. [2]

1.1 L'immunité naturelle (innée) et l'immunité adaptative

1.1.1. L'immunité naturelle (innée)

Le SI inné est un système de défense de l'hôte conservé au cours de l'évolution dont les principales caractéristiques sont partagées entre les plantes, les invertébrés et les mammifères [3][4]. La première fonction du SI inné est d'empêcher la pénétration des agents infectieux dans l'organisme par l'intermédiaire de barrières physiques telles que la peau ou les surfaces muqueuses des voies respiratoires et gastro-intestinales, et de barrières chimiques constituées par les sécrétions biologiques (le mucus, la salive et les sucs gastriques) [3]

1.1.1.1. Les PAMPs et les PRRs

Il arrive parfois que des agents bactériens franchissent ces barrières physiques de la peau. Dès lors le SI inné fait intervenir une seconde fonction qui consiste à déclencher une action en réponse à ce signal de danger. Cette action de détection et d'identification passe par l'intermédiaire de récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs : Pattern Recognition Receptors). Les PRRs sont exprimés par les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les cellules tueuses naturelles NK (« *Natural Killer* »), les polynucléaires, les mastocytes, les lymphocytes B et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires, cellules épithéliales)[5]. Ces récepteurs PRRs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (pour « *Pathogen Associated Molecular Patterns* ») ou des motifs moléculaires associés aux microbes ou MAMP (pour « *Microbial Associated Molecular Patterns* ») [6] [7] [8], présents à la surface des agents pathogènes et provoquant initialement la sécrétion de peptides antimicrobiens génériques (AMP) telle que la dermcidine sécrétée par les glandes sudoripares eccrines présentes dans la peau [9] [10].

Les PAMPs sont des motifs moléculaires très conservés du non-soi, car essentiels pour la survie des micro-organismes. Parmi ces PAMPs, on retrouve les lipopolysaccharides bactériens (LPS, endotoxines présentes sur les membranes cellulaires des bactéries Gram négatif) [11], la flagelline bactérienne, l'acide lipotéichoïque pour les bactéries Gram positif, [12] le peptidoglycane et les variants d'acides nucléiques normalement associés aux virus (l'ARN double brin (ARNdb), ou motifs CpG non méthylés) [12] [13].

Les PRRs peuvent être classées en trois groupes :

- **Les PRR solubles (opsonines)** qui jouent un rôle dans la phagocytose et dans l'inflammation. Il s'agit notamment des facteurs du complément [14] et des molécules de la phase aigüe de l'inflammation comme les pentraxines, CRP (protéine C réactive), SAP (sérum amyloïde P), et la molécule PTX3 (pentraxin3) [15].
- **Les récepteurs cytosoliques** qui sont impliqués dans la reconnaissance des composants bactériens ou viraux intracellulaires. Ils appartiennent à la famille des récepteurs NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins) [16] et à la famille des hélicases [17].
- **Les récepteurs membranaires d'endocytose** qui sont impliqués dans la phagocytose, l'inflammation, la réponse antivirale. Ils sont exprimés par les cellules à forte activité d'endocytose, telles que les CD et les macrophages. Ils appartiennent à la famille des récepteurs *scavenger* [18], à la famille des récepteurs aux lectines de type C (DC-SIGN, par exemple) [19], à la famille des récepteurs Toll-like (TLR) [19].

1.1.1.2. La phagocytose et la réaction inflammatoire

La troisième fonction du SI inné est de déclencher une réaction inflammatoire en recrutant sur le site de l'infection des cellules phagocytaires et des protéines du système immunitaire. Ces cellules, attirées par les gradients de chimiokines, migrent dans l'organe cible infecté pour internaliser et digérer les particules et micro-organismes pathogènes [20]. Ce processus, appelé phagocytose, comprend une phase d'adhésion, d'ingestion, de digestion et d'élimination de l'agent pathogène. Cette phagocytose est principalement exécutée par les neutrophiles, les CD et les macrophages [21].

1.1.2. L'immunité adaptative à médiation cellulaire

La **réponse adaptative** est un second système de défense contre les agents infectieux. Il est retrouvé uniquement chez les vertébrés (*cf. **Figure 1***). C'est une réponse lente et spécifique. Cette spécificité lui permet de s'adapter à l'apparition de diverses formes de variants à même de subir rapidement des modifications génétiques entraînant un échappement à la réponse immunitaire. Les cellules impliquées dans cette réponse sont les CPA (monocytes, macrophages, CD)[22], les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT) de type CD4 et CD8. L'immunité adaptative fait intervenir les récepteurs BCR présents à la surface des LB et les récepteurs TCR présents à la surface des LT. Ces récepteurs reconnaissent des parties d'éléments du non-soi (Ag). Les Ag sont présentés aux TCR d'un LT par l'intermédiaire du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Les CD8 reconnaissent le CMH-I présent à la surface de toutes les cellules nucléées alors que les CD4 reconnaissent le CMH-II présent uniquement à la surface des CPA. Une fois que le LT CD4 ou CD8 via son TCR reconnaît l'Ag présenté par le CMH, il subit un processus de maturation et d'activation pour devenir respectivement un CD4 auxiliaire ou un CD8 cytotoxique. Ce processus est caractérisé par une augmentation d'expression des molécules de co-stimulation (IL-12, TGF β , IL-10, IL-6...). De façon simplifiée et classique le LT CD4 auxiliaire est dit « le chef d'orchestre de la réponse immuns spécifique », c'est autour de lui que s'organise la réponse immune. Le LT CD8 cytotoxique détruit les cellules infectées en libérant par exocytose des vésicules contenant des granzymes et des perforines [23]. Comme exemple : les perforines forment des pores au sein de la membrane des cellules infectées.

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative a pour résultat m'établissement d'une mémoire immunitaire qui permet une réponse rapide en cas de rencontre ultérieure avec le même Ag. Cette réponse devient spécifique et adaptative puisqu'elle est renforcée lors d'un nouveau contact (= réponse anamnestic).

Les cellules cancéreuses produisent des néo-antigènes en rapport avec les altérations de leur génome. Ces néo-antigènes induisent une réponse immune chronique contre ces cellules de même type que la réponse contre les agents pathogènes [24] [25]. Malheureusement, ce système de défense n'est pas infallible et les cellules cancéreuses disposent d'outils qui permettent de le neutraliser, de s'en dissimuler, voire de le détourner mettant à mal l'homéostasie tissulaire. Les anomalies de cette homéostasie, par augmentation de la prolifération et/ou diminution de la mort cellulaire, sont à l'origine de l'accumulation des cellules malignes donnant naissance à une tumeur. Cette affection clonale peut toucher tout aussi bien la prolifération des lymphocytes B que la production d'immunoglobuline engendrant des lymphopathies malignes.

Chapitre 2 : Les TLRs et MYD88

Les récepteurs de type Toll-like appartiennent à la famille des PRRs. Leur découverte s'appuie sur les travaux du groupe de Jules Hoffmann qui a mis en évidence l'existence chez la drosophile de récepteurs Toll-like capables de reconnaître certains champignons et permettant d'activer la synthèse de molécules antifongiques [26].

Il faut attendre les années 2000 pour montrer qu'il existe treize paralogues TLRs identifiés chez les mammifères [27] [28] [29]. Ils sont au nombre de 10 chez l'Homme (TLR1 à 10) et 13 chez la souris (TLR1 à 13) bien que le TLR10 soit non fonctionnel chez cette dernière [30]. Le fait qu'une seule famille de récepteurs puisse servir à la reconnaissance microbienne chez des espèces aussi divergentes que la *Drosophila melanogaster* et *Mus musculus*, suggère que les séquences des TLRs sont fortement conservées au cours de l'évolution [31]. Ces récepteurs sont spécialisés dans la reconnaissance de certains PAMPs. Par exemple, les TLR1, 2, 4, 5, 6 situés au niveau de la membrane cytoplasmique reconnaissent des antigènes exogènes protéiques ou lipidiques : les TLR1, 2 et 6 reconnaissent les lipopeptides bactériens, le TLR5 reconnaît la flagelline, le TLR4 reconnaît le LPS [31] (cf. figure 2).

En revanche, les TLR3, 7, 8, 9 sont spécialisés dans la détection des composants viraux ou bactériens en reconnaissant surtout les acides nucléiques. Ils sont situés au niveau de la membrane endosomale ou lysosomale. Ces acides nucléiques peuvent notamment être de l'ARN viral double brin (TLR3) ou simple brin (TLR7 et 8) ou de l'ADN bactérien hypométhylé (TLR9). Ils sont surtout situés sur les cellules folliculaires dendritiques, les macrophages et les cellules B (cf. figure2) [32].

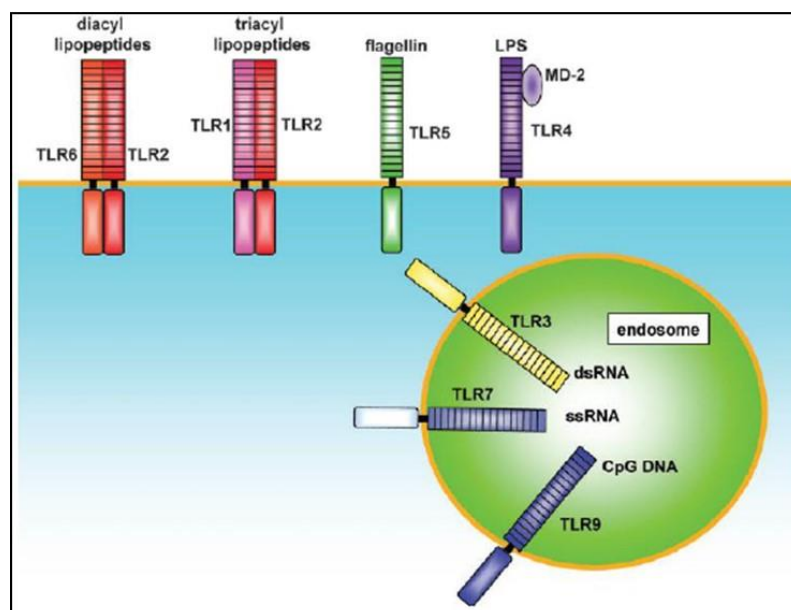


Figure 2 : Les différents TLR et leurs ligands :

Diacyllipopeptides activateur du TLR6-2, Triacyllipopeptides activateur du TLR 1-2, Flagéline activateur du TLR5, LPS activateur du TLR 4, dsRNA : ARN double brin, ssRNA : ARN simple brin, CpG DNA : ADN hypométhylé activateur des TLR 3-7 et 9 d'après Takeda *et al.* [32]

2.1. Structure des TLRs

Les TLRs présentent une structure proche de celle des récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I composés :

1. D'un domaine intracytoplasmique de 150 à 200 acides aminés environ, commun avec celui des IL-1R : le domaine TIR (Toll/IL-1R/R).
2. D'un domaine transmembranaire riche en cystéine.
3. D'une partie extracellulaire qui est différente des IL-1R. Elle comporte des domaines riches en leucines (les LRR, régions riches en leucine) alors que celle des IL-1R possède trois domaines immunoglobulines : [33] (cf. figure 3).

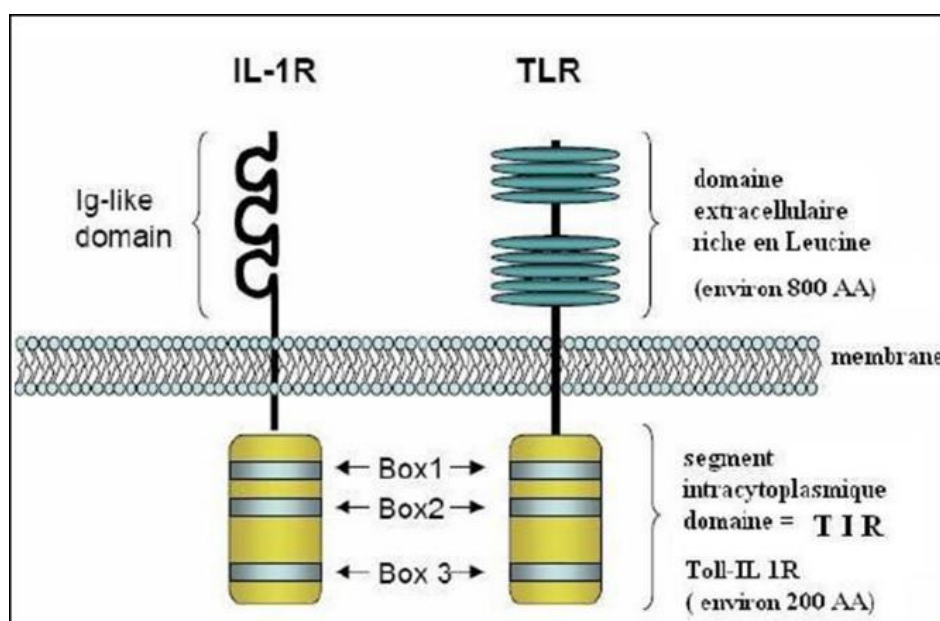


Figure 3 : Structures des TLR et IL-1R

Les deux récepteurs diffèrent par leur domaine extracellulaire, dans lequel IL-1R possède un domaine de type Ig, tandis que TLR a des répétitions riches en leucine (LRR). La région intracellulaire est la même, et contient le domaine Toll/IL-1R (TIR) responsable de la similitude de signalisation entre les récepteurs. D'après Essakalli *et al.* [33]

Bien que la plupart des TLRs semblent fonctionner comme des homodimères, certains TLR tels que les TLR2 forment des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6.

Ces changements de conformation font suite à l'activation des TLRs par leurs ligands. La signalisation des TLRs se fait par le recrutement de molécules adaptatrices spécifiques conduisant à l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et IRF que je décrirai plus loin, et aboutit à la libération de diverses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 ou TNF- α . L'initiation de cette cascade de signalisation dépend de la liaison du domaine TIR de la partie intracellulaire des TLR aux protéines adaptatrices cytosoliques contenant aussi un domaine TIR [34].

2.1.1. Les protéines adaptatrices des TLRs

Les quatre principales protéines adaptatrices sont : la protéine MYD88, la protéine TIRAP (Toll/IL-1 Receptor Adapter Protein), connue aussi sous le nom de MAL (pour MYD88 Adapter-like Protein), la protéine TRIF (TIR-containing adapter Inducing IFN β , également connu sous le nom de TICAM1) et la protéine adaptatrice TRAM, (également connu sous le nom de TICAM2) (*cf. figure 4*) [35] [36] [37] [38].

Ces molécules sont très importantes pour la transduction de la signalisation TLR. Une fois activés, tous les TLR recrutent MYD88 sauf TLR3 qui fait intervenir TRIF [39] [40]. En plus de MYD88, certains TLR recrutent d'autres molécules adaptatrices : c'est le cas des TLR 2 et 4 qui font appel à une protéine adaptatrice supplémentaire TIRAP qui interagit avec le domaine TIR de MYD88 [41] [42] (*cf. figure 5*). On distingue deux voies de signalisation pour la transduction de signalisation des TLRs : une voie dépendante de MYD88 dans laquelle MYD88 joue un rôle central et la voie indépendante de MYD88 faisant intervenir TRIF. Il est intéressant de noter que TLR4 est capable d'utiliser l'une ou l'autre des voies de signalisation en associant respectivement MYD88 à TIRAP et TRIF à TRAM.

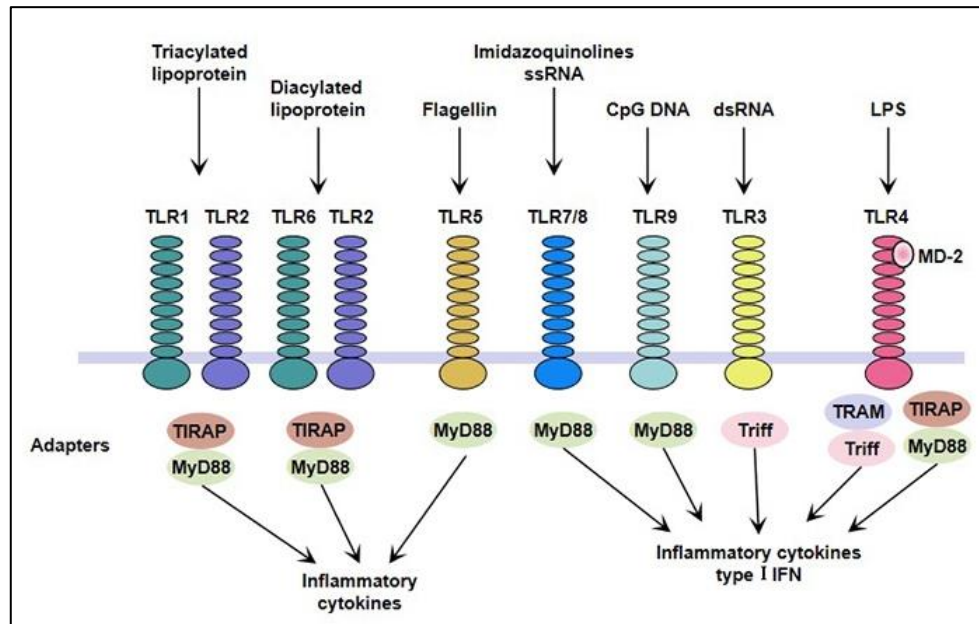


Figure 4 : Les TLRs et leurs molécules adaptatrices. Le recrutement des protéines adaptatrices diffère en fonction des TLRs activés. Tous les TLRs font intervenir la protéine adaptatrice MYD88 à l'exception de TLR 3 qui fait intervenir TRIF d'après Kawai *et al.* [35]

2.1.2. Structure de la protéine MYD88

La protéine MYD88 a été décrite pour la première fois en 1990, en tant que facteur de différenciation myéloïde 88 (MYD88) [43] [44] [45]. Le gène *MYD88*, positionné en 3p22.2 (bras court du chromosome 3) chez l'homme, code une protéine adaptatrice cytoplasmique de 296 acides aminés. MYD88 est cruciale pour le recrutement des protéines de signalisation aux récepteurs TLR/IL-1R [46]. La protéine MYD88 a une structure modulaire composée d'un domaine de mort (DD, Death Domain) à l'extrémité N-terminale et d'un domaine de récepteur Toll/IL-1 (TIR) à l'extrémité C-terminale séparée par une courte région de liaison, appelée domaine intermédiaire [37] [43] (*cf. figure 5*).

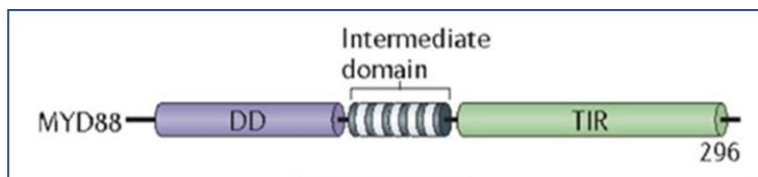


Figure 5 : Structure de MYD88.

La protéine MYD88 est constituée d'un domaine DD, d'un domaine intermédiaire et d'un domaine TIR. Adapté d'après GAY *et al* [37]

2.2. Signalisations TLRs MYD88 dépendantes

Les voies de signalisation TLRs dépendantes de MYD88 conduisent à l'activation des voies MAP kinases, NF- κ B et IRF aboutissant à la translocation dans le noyau de ces facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et IRF (IRF1, IRF3, IRF5, IRF7) qui induisent l'expression et la production de cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL1- β , TNF α , IL6) ou des Interférons de type I (IFN α , IFN β) [47] (*cf. figure 6*).

Dans les paragraphes suivants, nous allons étudier en détail chacune de ces voies et plus particulièrement la voie NF- κ B qui est au cœur de mon sujet (*cf. chapitre 3*).

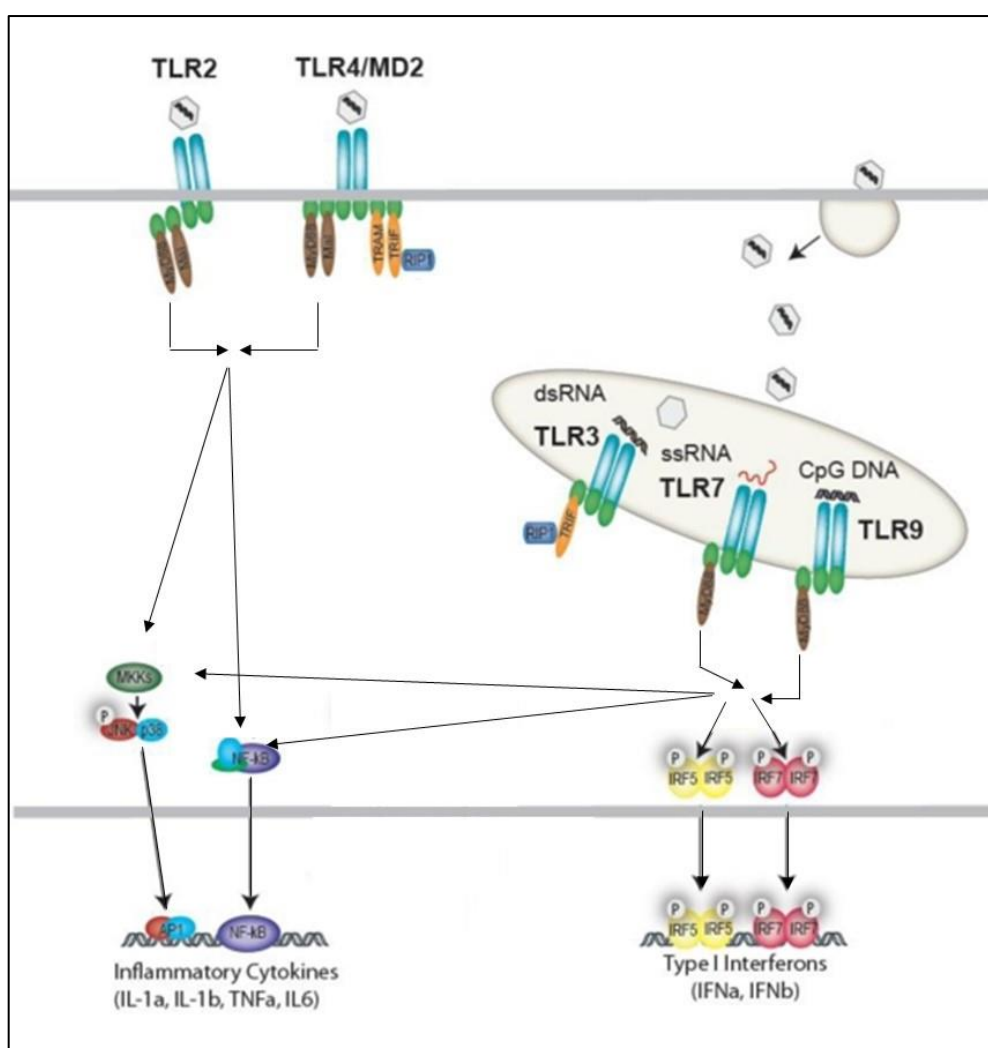


Figure 6 : Les fonctions de MYD88

Dans la signalisation TLR MyD88 dépendante, Myd88 est décrit pour activée les facteurs de transcription NF- κ B, JNK, p38, IRF1-5 et IRF7 en réponse à tous les TLRs sauf TLR3. Ce cas particulier utilise la protéine adaptatrice TRIF pour activer lui aussi les facteurs de transcription NF- κ B, JNK, p38 et IRF3. Myd88 en activant ces divers facteurs de transcription induit l'expression, après stimulation des TLRs, de cytokines pro-inflammatoires, IFN, du TNF α etc... Adapté d'après Thompson *et al.*[47]

2.2.1. Myddosome

Lorsque les TLRs sont activés, ils recrutent une molécule adaptatrice telle que MYD88 pour propager le signal au niveau du domaine DD. Pour cela, MYD88 interagit par l'intermédiaire de son domaine TIR avec le domaine analogue des récepteurs IL-1R ou TLR [48]. Il a été montré que MYD88 forme des homodimères et favorise l'activation et le recrutement à la membrane plasmique de deux kinases associées au récepteur IL-1 : IRAK-4 et IRAK-1 (IL-1R-associated kinase 4 et 1) [49]. Une interaction homophile entre le DD de MYD88 et son homologue trouvée à l'extrémité N-terminale des kinases est requise pour un tel événement [50]. L'oligomérisation des 6 à 8 sous-unités de MYD88 et de 4 sous-unités d'IRAK-4 avec 4 sous-unités d'IRAK-1/2, [51] [52] forme un complexe moléculaire appelé le myddosome [53] [54] (cf. figure 7).

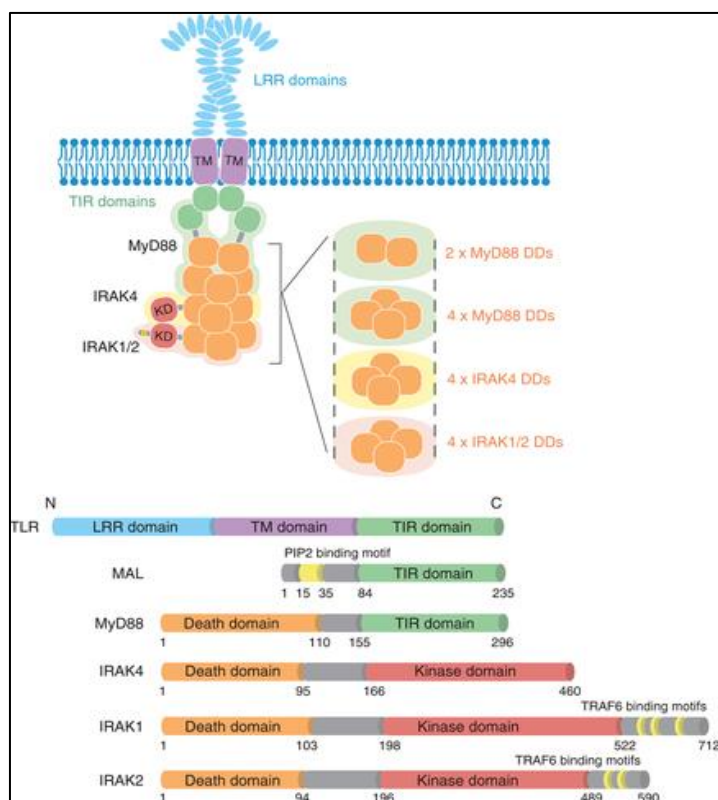


Figure 7 : Le myddosome.

Ce schéma représente un dimère TLR4 montrant l'arrangement de ses domaines TIR cytosoliques (en vert) en association avec les domaines MYD88 TIR (en vert), les domaines de mort (DD) de MYD88 et des kinases associées au récepteur de l'interleukine-1 (IRAK-4 et IRAK-1/2) sont représentés en orange. Les six domaines DD de MYD88 disposés en 2 anneaux fournissent une plate-forme pour le recrutement de 2 couches successives de 4 IRAK4 et 4 IRAK1/2, dont l'ensemble forme le complexe Myddosome. Adaptées d'après Katherine R *et al* [53] .

2.2.2. Les complexes TRIKA

Un modèle récent propose que MYD88 se lie à IRAK-4 et favorise l'activation et la phosphorylation d'IRAK-1 par IRAK-4 [51] [55].

IRAK-4 libère IRAK-1 dans le cytoplasme en le phosphorylant pour former un signalosome avec l'enzyme TRAF6 (« Tumour necrosis factor receptor-associated factor 6 ») (cf. [figure 9.2](#)). TRAF6 est une ubiquitine ligase E3 qui a besoin, pour agir, de la présence du complexe enzymatique TRIK1. TRIK1 est un complexe enzymatique E2 composé de Uev1A (« Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1 ») et de UBC13 (« Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2N ») [56][57]. Ce complexe E2 fonctionne avec TRAF6, pour synthétiser une chaîne de polyubiquitine au niveau de la lysine K63 sur des protéines cibles, telles que NEMO (« NF- κ B Essential Modulator ») et TRAF6 elle-même [58] [59]. L'auto-ubiquitination de TRAF6 facilite le recrutement du complexe trimérique TRIKA2 constitué de la protéine kinase TAK1 (« Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1 ») et de deux protéines adaptatrices TAB1 et TAB2 [60] [61]. Ce recrutement facilite l'interaction directe TRAF6-TAK1 et favorise l'activation de TAK1 par ubiquitination K63 de TAK1 est activée [62] (cf. [figure 8](#)).

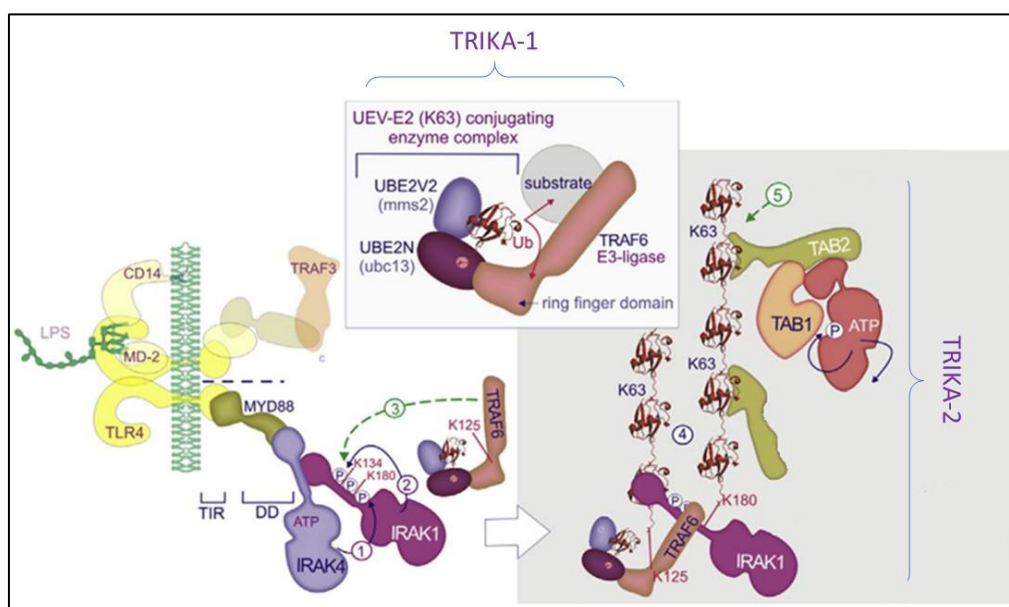


Figure 8 : Complexes TRIKA.

Formation de complexes de signalisation médiée par TRAF6. Recrutement de l'IRAK4 apporte IRAK1 dans le complexe de signalisation. IRAK4 phosphoryle IRAK1 (1) et cela entraîne un changement de conformation qui permet à IRAK4 de phosphoryler lui-même sur de nombreux résidus en particulier dans la région entre le domaine de la mort et le domaine kinase (2). Cela provoque à son tour le recrutement et l'activation d'un complexe de transfert d'ubiquitine (3), comprenant TRAF6 (E3-ligase) et UBE2N (anciennement Ubc13) et UBE2V2 (anciennement mms2). Ces deux derniers constituent le Complexe enzymatique de conjugaison EUV-E2 (TRIK1). IRAK4 et TRAF6 sont des substrats. L'enzyme UBE2N/UBE2V2 relie les ubiquitines via leur glycine C-terminale (G76) et la lysine en position 63 (K63) (4). La chaîne K63-ubiquitine agit comme un site d'amarrage pour deux complexes de kinase. L'un d'eux comprend TAB2 couplé à la K63 et TAK1 avec TAB1 (5) d'après Kramer *et al.* [62]

2.2.3. Les facteurs IRFs

2.2.3.1. IRF 7

La stimulation de TLR9 ou TLR7 situés dans l'endosome par les acides nucléiques viraux ou bactériens déclenche l'activation du facteur de transcription IRF-7. Un complexe comprenant MYD88, IRAK-4, TRAF6, TRAF3, IRAK-1, IKK α et IRF7 est recruté au niveau des TLRs. IRF7 phosphorylé par IRAK-1 et IKK α et ubiquitinylé par TRAF6 forme un dimère et est transloqué au noyau pour activer la transcription de gènes des interférons de type I (IFN α et IFN β) [63] [64] [65] (cf. figure 9).

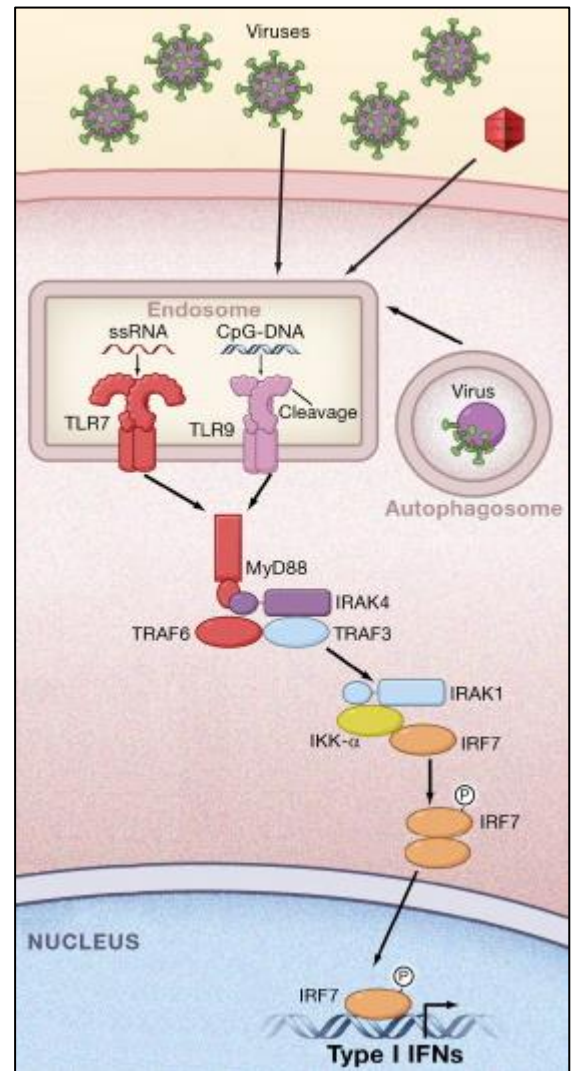


Figure 9 : Voie de signalisation via les TLR7 et 9 aboutissant à l'activation du facteur de transcription IRF-7.

Après activation, IRF-7 est transloqué au noyau afin de permettre la transcription des gènes IFN- α/β . d'après Takeuchi *et al.*[63]

2.2.3.2. IRF1 et IRF5

Dans les signalisations TLR2, 4, 5, 7 et 9, IRF5 est recruté au niveau du complexe myddosome-TRAF6 puis transloqué au noyau pour activer la transcription de cytokines pro-inflammatoires

(IL-6, TNF- α)[66].

IRF1 est recruté de la même manière que IRF5 lors des signalisations TLR7 et 9 et contrôle la production d'interleukine IL12, de p35, d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et d'IFN- β , [38] [67](cf. **figure 10**).

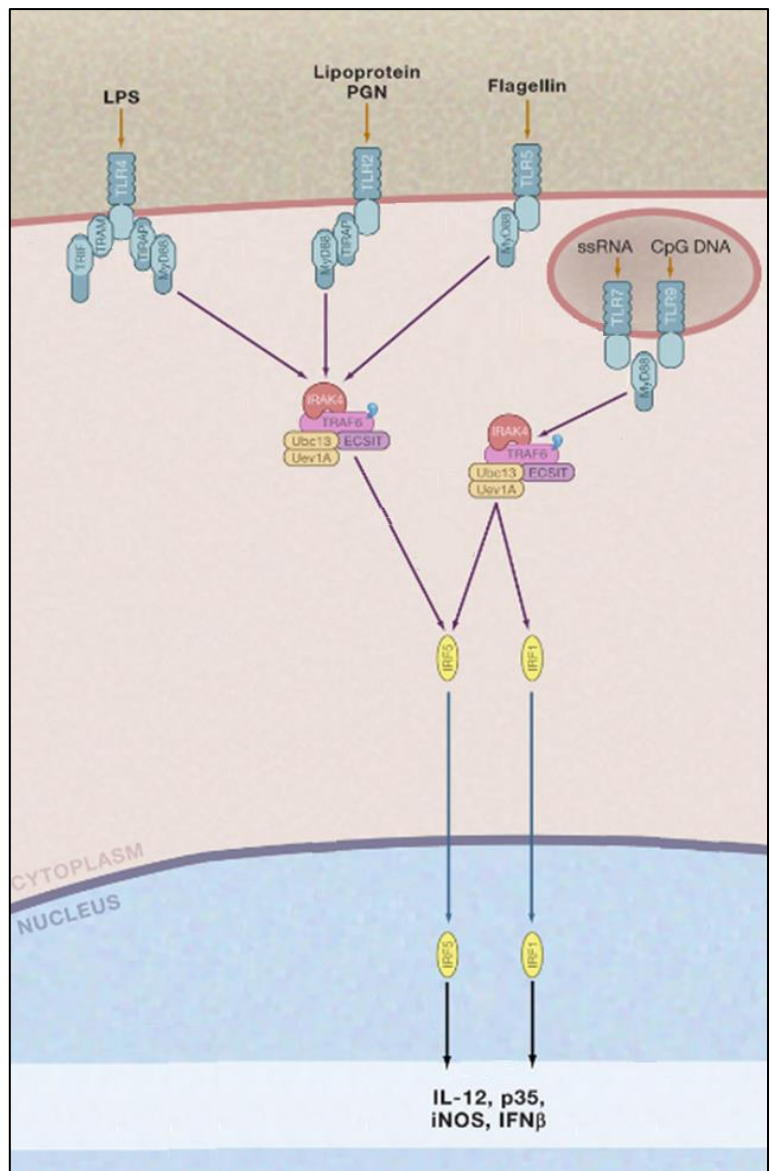


Figure 10 : Signalisations TLR activant les facteurs de transcription IRF-1 et IRF-5.

IRF-1 et IRF-5 activés sont ensuite transloqués au noyau afin de permettre la transcription des gènes pro-inflammatoires, tel qu'IL-6, IL-12 IFN- β . d'après Kawai *et al.* [67]

2.2.4. Le facteur de transcription AP-1 avec la voie MAP Kinases

La voie des « Mitogen Activated Protein kinases » (MAP kinases) constitue l'une des voies principales de transmission des signaux de prolifération apportés par les facteurs de croissance [68]. Cette voie, après activation des TLRs, est à l'origine d'une cascade de phosphorylation au cours desquels une MAP Kinase d'ordre 3 (MAP K3), phosphoryle et active une MAP Kinases d'ordre 2 (MAP KK) qui phosphoryle et active une MAPK d'ordre 1 (MAP K). Les MAP kinases sont des Ser/Thr kinases qui incluent JNK/SAPK, ERK et p38 [69].

Lorsque TRAF6 se lie à TAK1, cela active la voie des MAP Kinases qui permet la phosphorylation de p38 et JNK. JNK phosphoryle à son tour c-Jun [70] [71]. c-Jun activé s'homodimérise et/ou s'hétérodimérise avec c-Fos générant le complexe de transcription de la protéine activatrice-1 (AP-1) [72] [73]. L'activation transcriptionnelle des composants AP-1 par les MAP kinases induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires tel que IL-1 α , IL-1b, TNF α , IL6 [69] [74]. Les chémokines tels que IL8, MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), les molécules d'adhésion telle que la voie VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intracellular Cell Adhesion Molecule), P-sélectine, les récepteurs membranaires (CMH, Intégrine β) [63] (cf. *figure 11*).

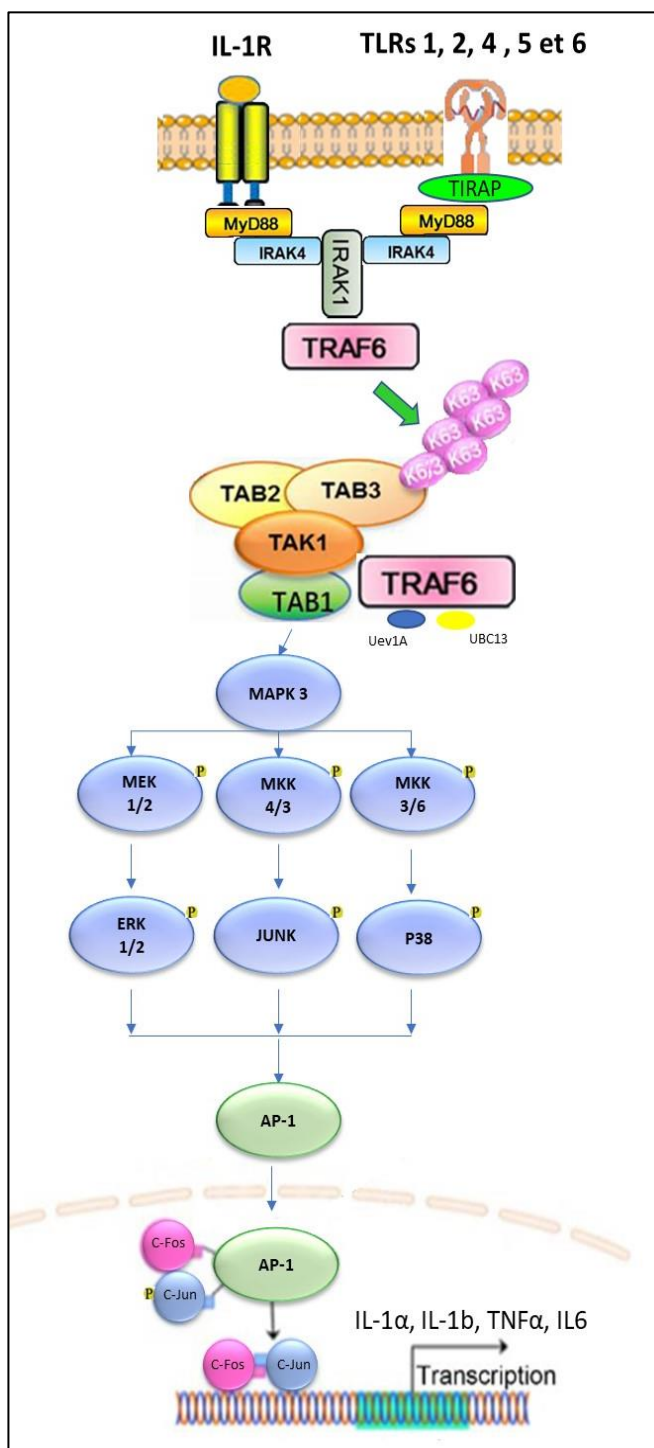


Figure 11 : Signalisations TLRs activant le facteur de transcription AP-1.

TLR2 et 4 répond à une variété de stimulus entraînant l'activation de la voie NF- κ B et MAPK via MyD88. La voie MyD88-dépendante via l'activation transcriptionnelle des composants AP-1 induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 α , IL-1b, TNF α , IL6.

2.2.5. Le facteur de transcription NF- κ B

NF- κ B forme une famille de facteurs de transcription qui participent à divers processus biologiques, notamment la réponse immunitaire, l'inflammation, la croissance et la survie cellulaire, et le développement [75] [76] [77]. On sait maintenant que cette voie est utilisée par de nombreuses cellules normales et cancéreuses pour favoriser leur survie. NF- κ B a d'abord été défini dans les lymphocytes B comme un facteur de transcription régulant l'expression de la chaîne légère *kappa* des Ig [78] et comme étant associé à la mort cellulaire. L'activation NF- κ B associé à la mort cellulaire constitue un avantage majeur pour la transformation du lymphocyte B. [79].

Dans les lymphocytes B, l'activation NF- κ B se produit de façon transitoire en aval de nombreux récepteurs, tels que le BCR, le CD40, le récepteur BAFF et divers TLRs.

NF- κ B influe sur la biologie de la cellule à travers deux voies de signalisation principales, la voie d'activation « alternative » et la voie d'activation « classique ». Ces deux voies seront détaillées dans le chapitre 3 consacré à NF- κ B.

2.2.6. Régulation de la signalisation TLRs MYD88 dépendante : IRAK-M

IRAK-M connu sous le nom IRAK-3 est une sérine/thréonine kinase IRAK, codée par le gène *IRAK3* [80]. La famille IRAK est composée de deux kinases activatrices, IRAK-1 et IRAK-4, et de deux kinases inhibitrices, IRAK-2 et IRAK-M. L'expression d'IRAK-M est limitée aux monocytes/macrophages, alors que les autres IRAK sont omniprésents [81].

À partir du modèle murin déficient pour *Irak3*, [81] il a été observé une production accrue de cytokines pro-inflammatoires lorsque ces souris sont infectées par des bactéries vivantes ou mortes. Dans cet article, les auteurs montrent que l'absence d'IRAK-M augmente la réaction inflammatoire intestinale lors d'une infection avec la bactérie pathogène entérique *Salmonella typhimurium* puisque les souris *Irak-m^{-/-}* infectées présentent des plaques de Peyer agrandies et enflammées, contrairement aux souris de type sauvage.

Au vu de ces résultats, Kobayashi *et al* ont proposé le modèle suivant pour la fonction IRAK-M[81]. L'activation des TLRs par les PAMPs dimérise ces récepteurs. IRAK-1, IRAK-4 et la protéine adaptatrice MYD88 sont ensuite recrutés, entraînant l'activation d'IRAK-1 et d'IRAK-4 et leur phosphorylation ultérieure (cf. **figure 12 A**). La phosphorylation d'IRAK-1 ou d'IRAK-4 entraîne un changement de conformation, provoquant une perte d'affinité pour le complexe de signalisation TLR et permettant la stimulation de la signalisation en aval par association avec des molécules de signalisation telles que TRAF6. IRAK-M inhibe ce processus en inhibant la dissociation de IRAK-1 et IRAK-4 du complexe de signalisation TLR soit en inhibant la phosphorylation de IRAK-1 et IRAK-4, soit en stabilisant le complexe TLR/MYD88/IRAK-4 (cf. **figure 12 B**). Ainsi les auteurs montrent que la kinase IRAK-M exerce ce rôle de régulateur négatif critique sur la voie MYD88 TLR dépendante.

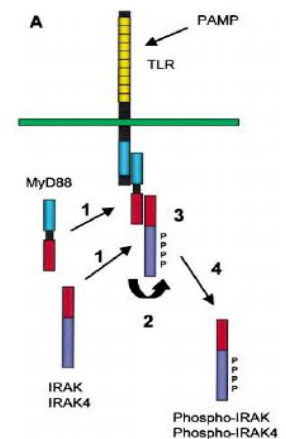


Figure 12 A : Activation de la voie de signalisation MYD88 TRL dépendante [81].

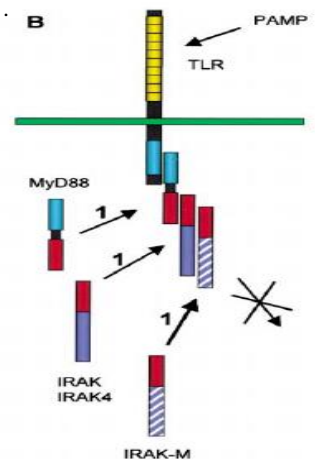


Figure 12 B : Inhibition de la voie de signalisation MYD88 TRL dépendante [81].

2.3. Signalisations TLRs MYD88 indépendantes

Les voies de signalisation TLRs indépendantes de MYD88 (*cf. figure 7*) sont retrouvées lors de l'activation des TLR 3 et TLR4 et faisant alors intervenir comme principale protéine adaptatrice TRIF [82]. En réponse à la stimulation par l'ARN double brin issu d'agents infectieux, TLR3 recrute directement une molécule adaptatrice TRIF, contrairement à TLR4 qui a besoin d'un intermédiaire, TRAM [83][84]. TRIF a la particularité de pouvoir s'associer avec TRAF3 et TRAF6 à travers ses motifs TRAF-binding, en N-terminal [85]. La protéine RIP1 (Receptor-Interacting Protein s'associé à TRAF6 et au motif RHIM (Receptor-interacting protein Homotypic Interaction Motif) contenu dans TRIF pour activer la voie NF- κ B [86] et la voie des MAPKinases (*cf. figure 13*) [87] [88]. TRAF3, quant à lui, va induire la phosphorylation de IRF3 et IFR7. Le complexe IRF3/IFR7 phosphorylé est alors transloqué au noyau pour induire l'expression des gènes des IFNs de type I (IFN-1) [63] (*cf. figure 13*).

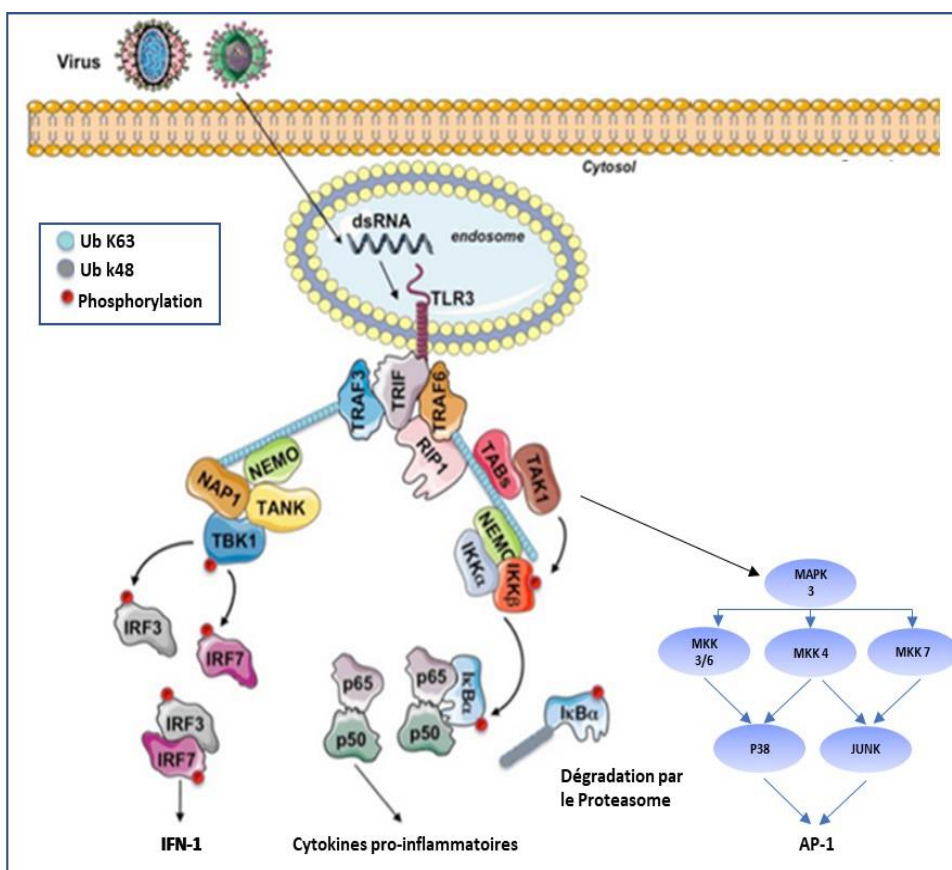


Figure 13 : Exemple d'une voie de signalisation indépendante de MYD88 via l'activation du TLR3.

Au niveau de l'endosome TLR3 va être activé par les ARNs double brin. TLR3 est activé par la voie TRIF dépendante et non MYD88 dépendante. L'activation de TRIF va permettre le recrutement de TRAF6 et RIP1 ainsi que TRAF3. Le couple TRAF6 et RIP1 est responsable de l'activation de la voie NF- κ B et MAPK3 alors que TRAF3 est responsable de la phosphorylation du complexe IRF3/IRF7 responsable de l'induction de gène de IFN de Type I.

Chapitre 3 : NF- κ B

Bien qu'elles soient similaires en de nombreux points, les deux voies de signalisation dites « alternative » et « classique » de NF- κ B, se distinguent, non seulement par leurs acteurs moléculaires, mais également par les activateurs de ces deux voies induisant ainsi des réponses cellulaires distinctes. Avant de détailler chacune des deux voies, je vais revenir sur les différentes sous-unités et régulateurs de la voie NF- κ B.

3.1. Les différents régulateurs de NF- κ B

3.1.1. La famille des protéines kinases IKK

Les sous-unités de NF- κ B se déplacent entre le cytoplasme et le noyau. Ces déplacements sont régulés par les protéines kinases IKK qui répondent à l'activation des TLRs par les PAMPs.

La famille des protéines kinases IKK est constituée de deux kinases catalytiques IKK α , IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ également connue sous le nom de NEMO [89] [90] [91]. Lorsqu'elles sont associées entre elles, elles forment le complexe IKK α /IKK β /NEMO. IKK α et IKK β sont exprimés de manière ubiquitaire et possèdent un domaine kinase en position N-terminale, un domaine Leucine Zipper et un domaine hélice-boucle-hélice (HLH, Helix Loop Helix) en position C-terminale (Fig. 2). Le domaine Leucine Zipper est responsable de la dimérisation des kinases et la présence de mutations dans cette région rend les kinases inactives, contrairement au domaine HLH dont la présence peut s'avérer superflue [92]. Les parties C-terminales de IKK α et IKK β sont essentielles pour leur interaction avec la sous-unité régulatrice NEMO, qui est médiée par une séquence hexapeptidique (LDWSWL) appelée domaine de liaison NEMO (NBD) (*cf. figure 14*) [93] [94] [95].

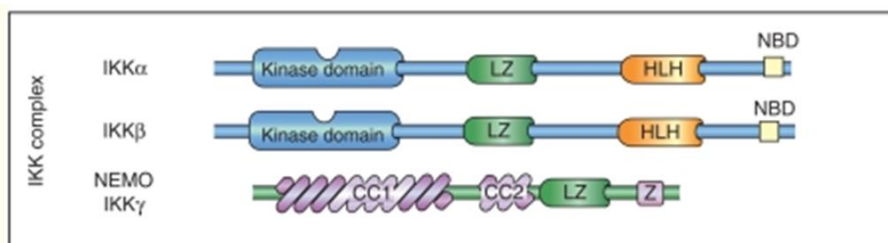


Figure 14 : Famille des IKKs.

La famille des protéines kinases IKKs est constituée de deux kinases catalytiques IKK α , IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ . Les domaines kinase, leucine zipper (LZ), hélice-boucle-hélice (HLH) et d'un domaine de liaison à NEMO (NBD) sont caractéristiques des IKK α et IKK β . Contrairement à IKK γ qui lui est constitué de deux bobines enroulées (CC1-2). d'après Oeckinghaus et Ghosh [93]

3.1.2. Les sous-unités de NF- κ B

La famille de facteurs de transcription NF- κ B se compose de NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105), NF- κ B2 (p52 et son précurseur p100), RelA (également appelé p65), RelB et c-Rel (cf. **figure 15**) [75]. Ces facteurs de transcription sont tous caractérisés par la présence d'un domaine d'homologie Rel (« Rel Homology Domain », RHD) en position N-terminale responsable de l'homo et hétérodimérisation ainsi que de la liaison à l'ADN spécifique de la séquence. RelA, RelB et c-Rel possèdent un domaine C-terminal d'activation de la transcription (TAD), contrairement aux sous-unités p52 et p50 [75]. Alors que RelB s'hétérodimérise avec les précurseurs p100 et p105 ainsi que leur forme active respective p52 et p50, RelA et c-Rel s'hétérodimérisent majoritairement avec p50 [87][96][97] [98]. Contrairement à d'autres membres de la famille NF- κ B, RelB possède également un motif de fermeture éclair à leucine (LZ) dans son extrémité N terminale, qui joue un rôle régulateur transcriptionnel important [75].

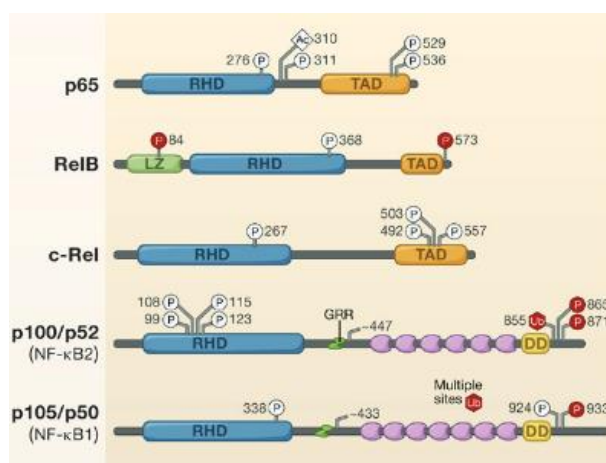


Figure 15 : Famille des NF- κ B/Rel . La famille de facteur de transcription à NF- κ B est composée de 5 facteurs de transcriptions qui sont p65, RelB, c-Rel, p50, et p52. D'après Matthew S.Hayden et al. [75].

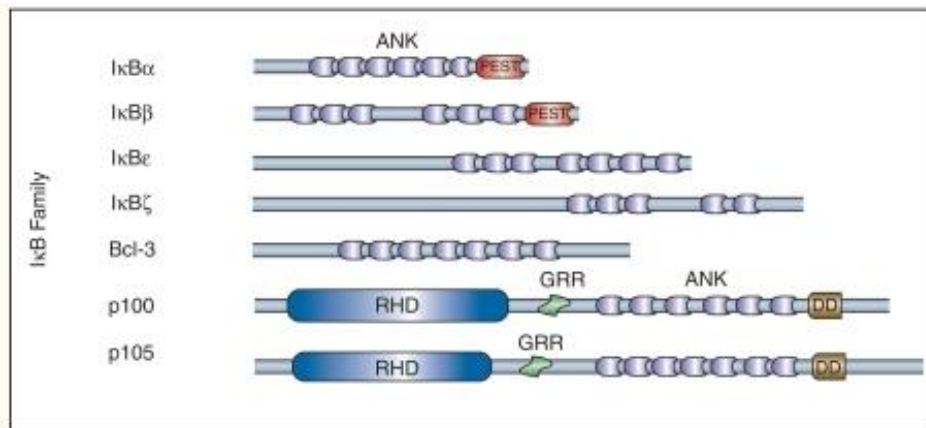


Figure 16 : Famille des protéines IκB.

La famille IκB comprend IκBα, IκBβ, IκBε et IκBζ et Bcl-3 ainsi que les protéines précurseurs p105 et p100. Les protéines IκB contiennent toutes des répétitions ankyrine (ANK). Les protéines précurseurs p100 et p105 possèdent en plus un domaine d'homologie Rel (RHD). Les domaines qui caractérisent chaque protéine sont indiqués schématiquement d'après Oeckinghaus et Ghosh [94].

3.1.3. La famille des protéines IκB

Les protéines IκB (IκBα, IκBβ et IκBε) jouent un rôle essentiel dans la régulation du signal NF-κB. Toutes les protéines IκB sont caractérisées par la présence de cinq à sept motifs répétés ankyrine, qui médient leur interaction avec le RHD (domaine d'homologie à Rel) des protéines NF-κB. La famille des protéines inhibitrices IκB possède une séquence d'exportation nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) qui leur permet d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie NF-κB. En effet, en absence de stimulation adéquate, les dimères NF-κB sont séquestrés dans le cytoplasme où ils sont maintenus inactifs suite à leur interaction avec les protéines inhibitrices IκB qui, en plus de masquer le signal de localisation nucléaire (NLS) des sous-unités de NF-κB, interfèrent au niveau de leur affinité de liaison à l'ADN. (cf. ***figure 16***).

Les protéines Bcl3 et IκBζ, sont apparentées aux IκB classiques. Elles sont constituées respectivement de six et sept domaines de répétition ankyrine. Cependant, contrairement aux IκB classiques, elles sont localisées dans le noyau et se comportent comme des activateurs transcriptionnels de NF-κB (cf. ***figure 16***) [75].

En sus d'être des précurseurs de p52 et p50 les protéines p100 et p105 ont la particularité de pouvoir fonctionner comme des inhibiteurs de la protéine Rel de la voie alterne et classique respectivement [99] [100]. En plus d'un domaine RHD côté N-terminal, ces précurseurs possèdent un domaine constitué de 7 répétitions ankyrines (ANK) qui joue un rôle important dans l'inhibition des protéines NF-κB ainsi qu'une région charnière riche en glycine (GRR) [101] [102] [103]. Ce site GRR est un site de maturation par clivage protéolytique. Bien que leur séquence et leur organisation globale soient similaires, la génération de p50 et p52 à partir de leurs précurseurs respectifs (p105 et p100) s'effectue par le biais de mécanismes distincts. La protéolyse de p105 en p50 est un phénomène constitutif alors que celle de p100, dont la forme active est p50, est finement régulée [97]. p105 peut, comme IκBα, subir une dégradation complète lors de la phosphorylation par IKKβ [93] [104] [105] (cf. ***figure 16***).

IκBα et IκBβ sont principalement connues pour inhiber les complexes contenant c-Rel et p65, avec IκBα ayant une affinité plus élevée pour p65/p50 que pour les complexes p65/p65 [106]. RelB lie exclusivement p100, alors que Bcl-3 et IκB ζ s'associent préférentiellement avec homodimères de p50 et p52 [107].

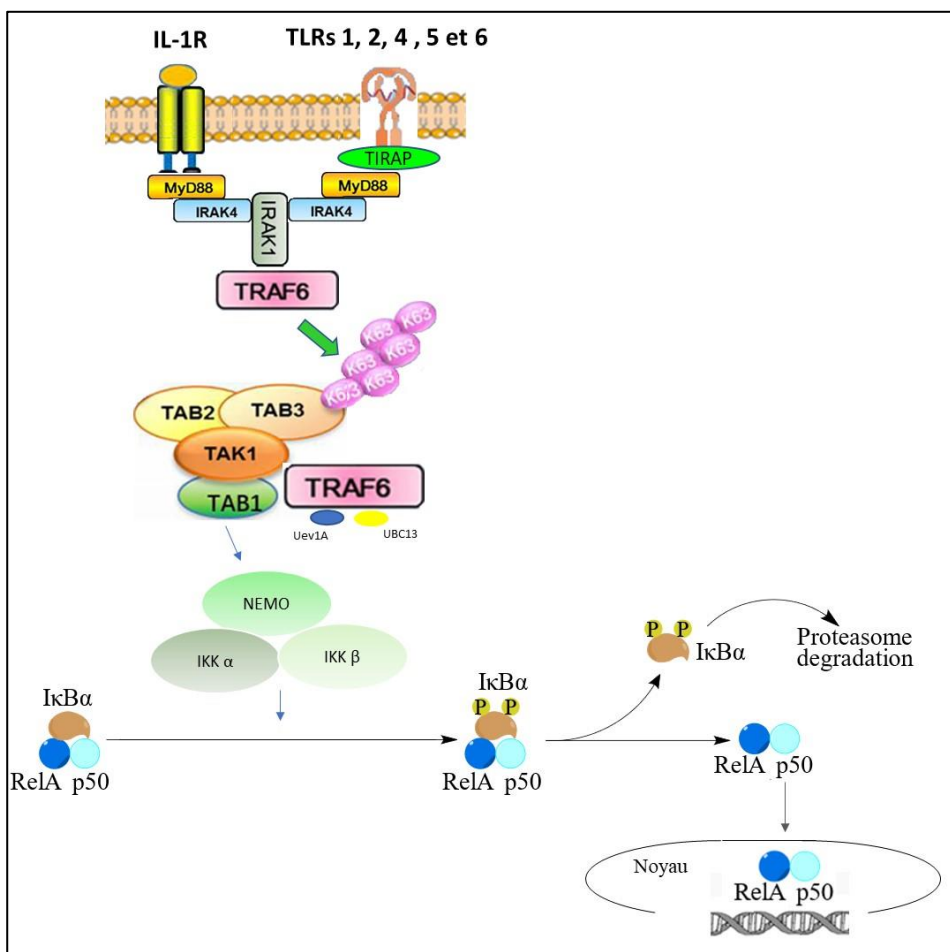


Figure 17 : Représentation schématique de la voie classique NF-κB médiée par MYD88.

La voie classique est activée par des signaux transmis par plusieurs récepteurs de surface cellulaire, tel que le TLR. L'activation se traduit par la translocation nucléaire des hétérodimères constitués par les sous-unités canoniques NF-κB, p65 et p50 où ils activent la transcription des gènes cibles.

3.2. La voie « classique » NF-κB et le myddosome

La voie d'activation « classique » de NF-κB est aussi dénommée de voie canonique de NF-κB. Elle implique les dimères RelA/p50 et c-Rel/p50 (cf. **figure 17**). Elle intervient dans la réponse immune et inflammatoire, dans la réponse anti-apoptotique, dans des phénomènes de différenciation normale et de cancérogenèse [108]. NF-κB a un effet direct sur la transcription des gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-6, IL-18...) permettant le recrutement de nouveaux macrophages et cellules dendritiques amplifiant ainsi la réponse innée. De plus, elle favorise également la mise en place de la réponse spécifique en permettant la synthèse de co-récepteurs dont le CD40, le CD80 et le CD86 nécessaires pour l'activation des lymphocytes B.

De nombreux stimuli extracellulaires peuvent activer la voie classique NF-κB via l'activation des TLRs. Des stress cellulaires tels que l'exposition à des radicaux libres, aux UV ou encore aux irradiations gamma en sont de puissants inducteurs ; de même que des produits viraux ou bactériens tels que le LPS et les ARN double-brin. De nombreuses cytokines peuvent également activer la voie classique NF-κB, notamment IL-1 et TNF-α. La voie classique d'activation de NF-κB utilise le complexe IκB kinase (IKK) composé des sous-unités α, β et γ (NEMO). Comme décrit précédemment TRAF6 ubiquitine TAB3 et NEMO en K63 et le complexe TAK1/TAB phosphoryle et active IKKα et β. IKK α et β phosphorylent à leur tour deux résidus sérines situés dans la partie N-terminale d'IκBα qui sera ensuite ubiquitinylée en position K48 conduisant à sa dégradation par le protéasome S26. [87] [100] [90]. Les dimères p50/RelA (p65) ainsi libérés sont transloqués dans le noyau rendant possible la transcription de gènes cibles spécifiques.

Cependant, la dégradation d'IκBα et par conséquent la transcription des gènes pro-inflammatoires tels que ceux codant TNFα et IL-6, peut s'effectuer par une autre voie impliquant également la voie classique de NF-κB : il s'agit de la voie tyrosine kinase de Bruton (Btk).

La BTK est la tyrosine kinase de maladie de Bruton. L'agammaglobulinémie liée au sexe ou la maladie de Bruton est caractérisée par un déficit en lymphocytes B matures et d'Ac circulant, mettant en évidence un rôle critique de BTK dans le développement B [109]. Il s'est également avéré important pour l'activation médiée par les IgE des mastocytes entraînant des réactions allergiques. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de la tyrosine Y551 de BTK par Lyn, induit l'activation de BTK. Cette activation est augmentée lors de la réticulation ou de la stimulation du BCR, du récepteur IgE

(FcεRII) et d'un certain nombre de récepteurs de cytokines tels que ceux de l'IL-3, IL-5, IL-6 et IL-10, suggérant un rôle central de BTK dans la réponse immunitaire [110] [111].

Dans les cellules B, BTK est décrit comme jouant un rôle ambivalent dans l'apoptose. En effet, lorsque les cellules B sont exposées à des intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI, *Reactive Oxygen Intermediates*), BTK fonctionne comme une molécule pro-apoptotique en diminuant l'activité de STAT3, tandis que l'association de BTK avec FAS peut empêcher l'induction de la mort induite par FAS [112].

BTK active la voie NF-κB par le BCR via MALT1, BCL10 et CARD11 ou via MYD88 en interagissant directement avec le myddosome [113]. En effet en 2003, Jefferies *et al.* démontrent à l'aide de mutants inhibiteurs de Btk et un inhibiteur spécifique de Btk, LFM-A13, que Btk régule l'activation de la voie NF-κB en réponse à une stimulation au LPS [114]. Btk, en s'associant avec TIRAP et MYD88, active par le biais soit du myddosome soit d'IKKα de la voie NF-κB [115]. (*cf. figure 18*)

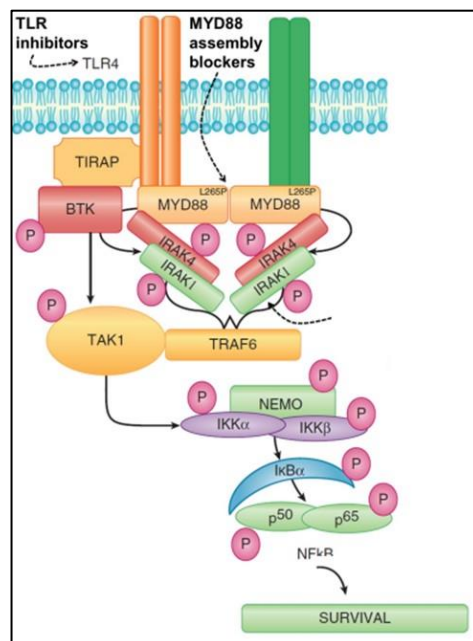


Figure 18 : Voie de signalisation NFκB médiée par Btk.

Btk peut activer la voie classique NF-κB soit par le biais du myddosome soit d'IKKα d'après D'après J. Castillo, *et al* [114].

Même s'il est établi que Btk intervient dans la voie NF- κ B, son rôle au niveau de la signalisation TLR est quant à lui controversé. En effet, des études contradictoires faites sur cellules mononucléées de patients porteurs de mutations dans Btk, ont montré dans un cas que Btk est requis pour la signalisation TLR4 alors que dans l'autre cas la signalisation TLR4 se fait indépendamment de Btk [116] [117].

Malgré cette controverse, la fonction anti-apoptotique de Btk dans les cellules cancéreuses est bien connue [118]. En effet, il a été démontré qu'au cours du développement des cellules B, la signalisation Btk remplit une fonction de survie et son absence chez les souris *Xid* entraîne une réduction du nombre de cellules B [119]. Btk devient donc une cible potentielle dans les thérapies anticancéreuses. En effet, dans des lignées cellulaires MW (Maladie de Waldenström), l'utilisation de l'ibrutinib, un inhibiteur de l'activité de la kinase BTK, entraîne une diminution de la complexation MYD88-BTK dans les cellules exprimant *MYD88* mutée.

L'ensemble, de ces résultats suggérant que Btk est un régulateur important dans la signalisation TLR dépendante de MYD88 via l'activation de la voie NF- κ B même s'il semble non indispensable à l'activation des cellules via le TLR dans les mastocytes et neutrophiles. Il n'en reste pas moins un acteur très intéressant pour l'utilisation de molécules anticancéreuses tel que l'ibrutinib.

3.3. La voie « alternative » NF- κ B

La voie dite « alternative » fait intervenir les protéines NF- κ B p100 et sa forme active p52 associée à RelB. Il semblerait qu'elle ne soit pas activée par les TLR mais plutôt par des ligands ayant une forte affinité pour les membres de la superfamille du TNF (*tumor necrosis factor*) (CD40L, lymphotoxine β , BAFF ou *B cell-activating factor belonging to the TNF family...*), [120] des protéines virales (LMP1 du virus EBV ou *Epstein-Barr virus*, Tax du virus HTLV1 ou *human T lymphotropic virus...*) ou la souche bactérienne Gram négatif *Helicobacter pylori*. Elle repose sur la protéolyse partielle de la protéine p100, l'inhibiteur de RelB [121].

Lorsque la cellule est au repos (cf. **figure 19 A**) p100, via ses répétitions d'ankyrine C-terminale, se lie à RelB et le complexe p100/RelB est maintenu dans le cytoplasme. La kinase MAP3K14 aussi connue sous le nom de NIK (« NF- κ B -inducing kinase »), est la kinase impliquée dans la phosphorylation de la partie C-terminale de p100. Elle est maintenue à des niveaux très bas en raison de la polyubiquitination de sa lysine 48 (K48) par le complexe E3 contenant TRAF2 et cIAP1/2 qui entraîne sa dégradation par le protéasome [115].

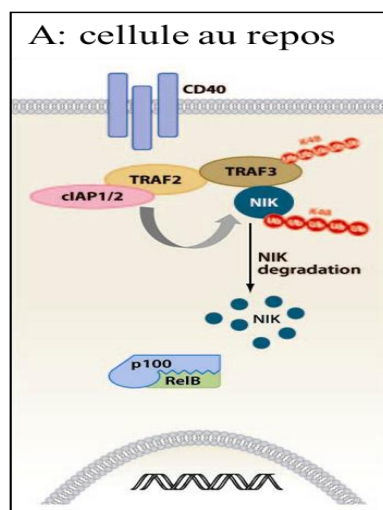


Figure 19 A : Signalisation de la voie alternative lorsque la cellule est au repos. En l'absence d'activation, les dimères RelB/p100 sont séquestrés dans le cytoplasme. D'après Castillo *et al* [115].

À l'inverse, lorsque la cellule est activée, par exemple, par la liaison du CD40 ligand au récepteur CD40 cela induit le recrutement du complexe TRAF3-TRAF2-cIAP1/2 vers le récepteur, où cIAP1/2

subit une polyubiquitination K63 TRAF2-dépendante (cf. **figure 19 B**) [76]. TRAF2 subit également une auto-ubiquitination K63. L'ubiquitination de cIAP1/2 induit l'ubiquitination de TRAF3 en K48, conduisant à sa dégradation par le protéasome. En conséquence, les niveaux de TRAF3 dans la cellule tombent en dessous d'un seuil critique et la protéine NIK ne peut plus être piégée. Cela conduit à sa stabilisation, son accumulation et son activation probablement par autophosphorylation. NIK activée entraîne la phosphorylation des dimères IKK α qui phosphorylent à leur tour p100 au niveau de résidus sérine spécifiques dans son domaine répété d'ankyrine C-terminal [122] [123]. Cet événement de phosphorylation permet la reconnaissance de p100 par le complexe ligase SCF IkB E3 entraînant sa polyubiquitination et la libération de l'hétérodimère p52 / RelB qui migre dans le noyau pour réguler la transcription de ses gènes cibles (*BCL3*, *REL*, *STAT5*, *IRF5*...) [123] [124].

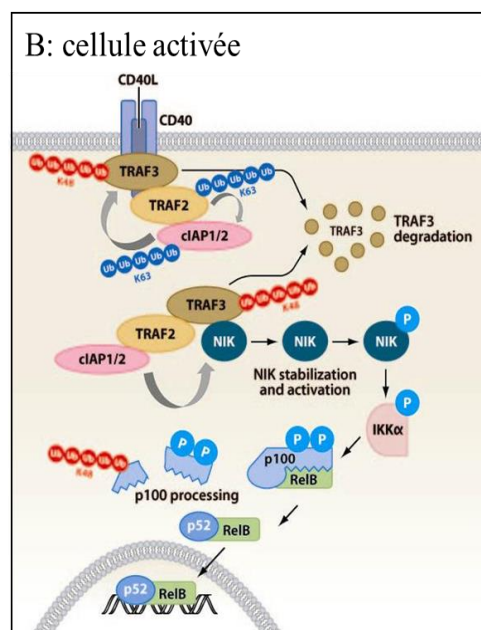


Figure 19 B : Signalisation de la voie alternative lorsque la cellule est activée. En réponse à l'un des stimuli cités plus haut, la protéine NIK sera libérée puis phosphorylée. NIK activée phosphoryle p100 alors associée à RelB, aboutissant à la protéolyse partielle de p100 et à la libération des dimères RelB/p52. D'après Vallabhapurap et al [76]

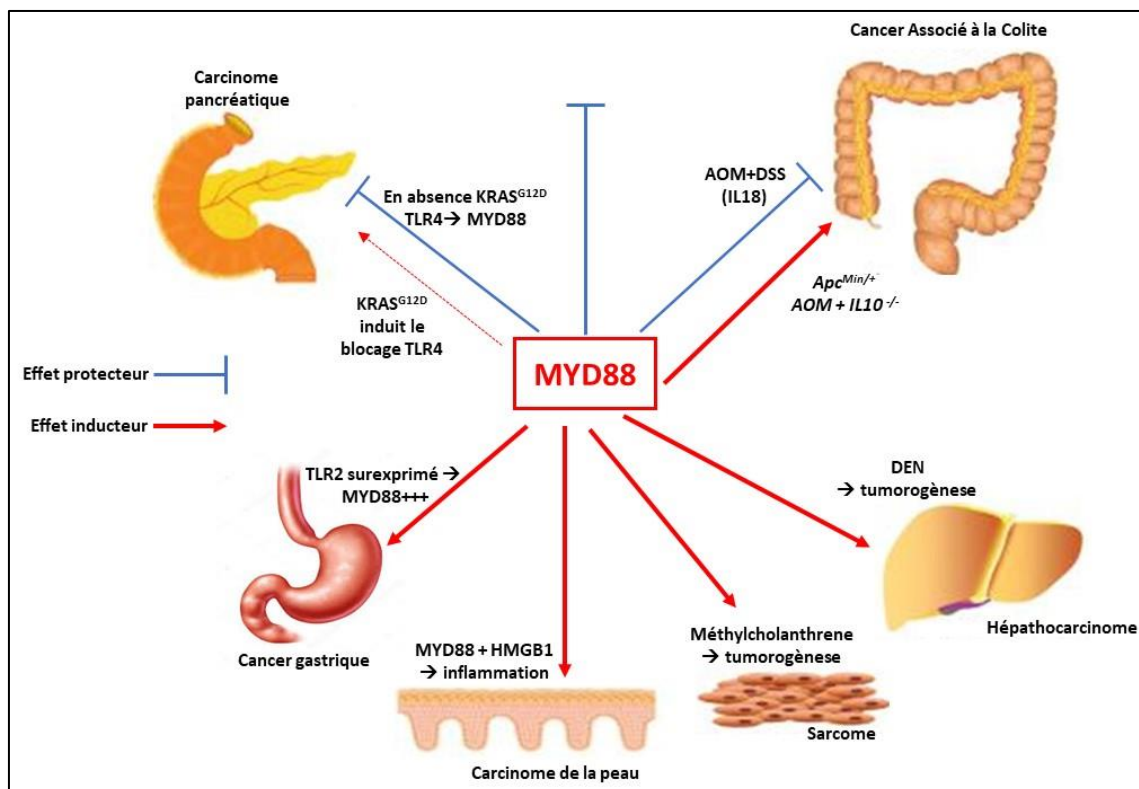


Figure 20 : Rôles divergents de MYD88 dans la cancérogenèse. Dans divers modèles expérimentaux de cancérogenèse, la signalisation MYD88 en aval des récepteurs de type Toll (TLR) ou des récepteurs de la famille de l'interleukine-1 (IL-1) a été associée à la suppression ou à l'augmentation de la formation de tumeurs. La figure montre les principaux effets rapportés avec indication des mécanismes proposés lorsque des effets divergents pour MYD88 d'après Salcedo *et al.* [125].

Chapitre 4 : MYD88 et cancer

Comme précédemment décrit, les TLRs régulent un large éventail de réponses biologiques, y compris les réponses inflammatoires et immunitaires au cours de la cancérogenèse. Les TLRs sont des régulateurs clés de la signalisation inflammatoire, médiés par des voies dépendantes et indépendantes de MYD88. Nous venons de voir que les signalisations TLRs activent notamment le facteur de transcription NF- κ B avec un risque, en cas de suractivation, d'aboutir à la cancérogenèse par le biais de signaux pro-inflammatoires, anti-apoptotiques, prolifératifs et pro-fibrogéniques [125].

De plus, lors de l'inflammation, des médiateurs pro-inflammatoires sont sécrétés non seulement par les cellules hématopoïétiques tel que les macrophages et les cellules dendritiques qui infiltrerent les tissus enflammés, mais également par les cellules épithéliales, stromales et endothéliales. Ces médiateurs affectent la prolifération et la fonction des cellules hématopoïétiques et tissulaires pouvant aboutir à un risque de transformation de ces cellules. [126]

De par les différentes voies activées par MYD88, celle-ci peut être impliquée dans l'inflammation intrinsèque des cellules induites par les oncogènes et dans l'inflammation extrinsèque associée au cancer. De nombreux travaux ont montré que la protéine adaptatrice MYD88 contribue à la cancérogenèse, notamment dans les cancers de la peau, du foie, du pancréas et du côlon, ainsi que dans certains sarcomes, en agissant en aval des récepteurs TLR ou de la famille IL-1[127]. MYD88 est surexprimée dans plusieurs tumeurs solides et son expression est associée à un mauvais pronostic comme dans le cas du cancer colorectal [128] [129]. Mais, MYD88 joue également un rôle anti-tumoral, par exemple dans la cancérogenèse virale (exemple avec le *papillomavirus humain*), ou dans le cancer du côlon induit par l'azoxyméthane (AOM)/dextrane sulfate de sodium (DSS) chez la souris [127]. Dans ce chapitre, nous discutons du rôle ambivalent de MYD88 avec d'un côté une action anti-tumorale permettant l'homéostasie, la réparation tissulaire et conférant ainsi une immunité contre la tumeur ou les agents pathogènes oncogènes et de l'autre une action pro-tumorale en favorisant l'inflammation (cf. **figure 20**) [127].

4.1. Effet anti-tumoral de MYD88

Des animaux déficients pour le gène codant MYD88 ont été utilisés pour étudier les interactions de cette dernière avec le micro-environnement et l'impact de ces interactions sur la cancérogenèse. En effet, les données sur la façon dont le déficit en MYD88 affecte la cancérogenèse sont en lien avec l'inflammation et le rôle des molécules de signalisation situées en aval de MYD88 comme NF- κ B [130].

La signalisation TLR/IL-1R contribue à l'homéostasie tissulaire, y compris la réparation et la régénération des tissus, et cela s'explique en partie par les effets pro-survie de la signalisation MYD88. Cet effet protecteur de MYD88 est démontré à l'aide des souris *Myd88*^{-/-} qui présentent une cicatrisation altérée ou retardée au niveau de la peau mais aussi au niveau des tissus du côlon et du foie. [131] [132] [133].

Dans le cancer du pancréas, MYD88 est également décrit pour jouer un rôle anti-tumoral en bloquant l'inflammation à l'origine de la cancérogenèse ou en maintenant l'équilibre hôte-microbiote [134]. En effet, en utilisant un modèle murin KRAS^{G12D} exprimant la mutation G12D de l'oncogène KRAS dans les cellules pancréatiques, Ochi *et al.* ont montré que la mutation KRAS^{G12D} induit le blocage de la voie TLR4 dépendante de MYD88 aboutissant à l'augmentation de l'inflammation pancréatique et de la progression maligne. Par conséquent, en absence de mutation KRAS^{G12D} la voie dépendante de MYD88 est rétablie conférant un effet anti-tumoral à MYD88 dans les cellules pancréatiques [134].

Ce rôle anti-tumoral de MYD88 a également été mis en évidence lors de l'étude du maintien de l'homéostasie/équilibre hôte-microbiote. En effet, Vaishnava *et al.*, démontrent que l'absence de MYD88 entraîne une altération de la ségrégation hôte-microbiote, se traduisant par une augmentation du nombre de bactéries adhérentes à la muqueuse intestinale [135]. La présence d'un trop grand nombre de bactéries a induit un phénomène inflammatoire au niveau des cellules intestinales lorsque MYD88 est absente. Or il est admis que les lésions tissulaires, la stimulation de la voie NF- κ B et une activité pro-inflammatoire agissent en synergie pour promouvoir la survenue des tumeurs, en favorisant le développement et la diffusion métastatiques. Dans le cas de cancer gastriques la présence du pathogène *H. pylori* induit une inflammation persistante générant un microenvironnement favorable à la cancérogenèse [136]. D'après Zur Havsén *et al.*, à peu près 20% des cancers sont d'origine infectieuse [137]. C'est dans ce contexte qu'il a aussi été décrit que, par son implication dans la réparation tissulaire, MYD88 peut également protéger contre la formation de tumeurs [127].

4.2. Effet pro-tumoral de MYD88

Deepak Mittal, *et al.* montrent que MYD88 est impliquée dans la tumorigenèse cutanée. Dans les cancers cutanés, TLR4 est activé par un ligand généré de manière endogène tel que le groupe à forte mobilité box-1 (HMGB1) [138]. HMGB1 est libéré par les kératinocytes nécrotiques et est nécessaire au recrutement des cellules inflammatoires et à l'initiation de l'inflammation. Les auteurs suggèrent que la libération initiale de HMGB1 déclenche une réponse inflammatoire par l'intermédiaire de MYD88 situé en aval de la voie TLR4 ce qui conduit au développement tumoral.

L'effet pro-tumoral de MYD88 a été décrit dans d'autres modèles de cancérogenèse comme par exemple, le modèle de sarcome induit par un carcinogène, le méthylcholanthrène (MCA). Dans ce modèle, les auteurs ont montré que les souris *Myd88*^{-/-} sont résistantes à la carcinogenèse induite par le MCA indiquant que MYD88 participe à la formation de ces tumeurs [139]. Cependant, les mécanismes intrinsèques ou extrinsèques par lesquels MYD88 affecte la formation des sarcomes restent à définir [139].

MYD88 est impliqué dans les modèles de cancérogenèse chimique, tel le carcinome hépatocellulaire (HCC) induit par la diéthylnitrosamine (DEN) chez la souris mâle. Dans cette étude les auteurs constatent que les souris mâles ayant reçu le carcinogène du DEN, ont une expression accrue d'IL6 dans les cellules de Kupffer, ceci de manière dépendante de MYD88 [140]. L'augmentation de production de l'IL6 induit par MYD88 est à l'origine de l'apparition de CHC. En effet, les auteurs dans leur étude démontrent qu'en administrant un traitement par les œstrogènes cela a permis de réduire la sécrétion d'IL6 chez les mâles diminuant ainsi le risque de CHC. Ceci est confirmé par le fait qu'en absence de MYD88 les souris mâles ne surexpriment plus l'IL-6 et par conséquent sont protégées du cancer du foie induit par le DEN.

4.3. Rôle ambivalent de *MYD88* : cas particulier du cancer du côlon

Le rôle complexe de MYD88 dans le cancer est mieux illustré par des études sur la carcinogenèse du côlon. Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (CU) collectivement appelées maladie inflammatoire de l'intestin (MII). Des études épidémiologiques ont fourni des preuves solides que les patients atteints de MII ont un risque accru de développer un cancer colorectal (CCR). Plusieurs études suggèrent que *MYD88* interviendrait dans ce processus via les voies de signalisation TLR dépendantes.

Rakoff-Nahoum *et al.* en 2007 démontrent que MYD88 contribue à la croissance et à la progression de l'adénome intestinal, dans les souris *Apc^{Min/+}*, présentant une mutation hétérozygote dans le gène de la polypose adénomateuse (*Apc*) connue pour développer de multiples adénomes intestinaux [141] [142]. Ils ont découvert que la signalisation dépendante de MYD88 contrôle l'expression de plusieurs gènes modificateurs clés de la tumorigenèse intestinale et joue un rôle essentiel dans le développement de tumeurs spontanées et induites par des cancérogènes.

En 2009, Uronis *et al.* utilisent des souris déficientes pour l'interleukine-10 (*Il10^{-/-}*) qui présentent une intolérance à leur microbiote intestinal. Ils démontrent que ces souris développent une colite spontanée à la suite de l'activation des cellules T induite par les microbes. Suite à de multiples injections d'agent génotoxique azoxyméthane (AOM) ces souris développent des tumeurs du côlon. Ainsi, ils démontrent que la présence de colite est directement corrélée au développement des tumeurs et agit comme un promoteur du cancer colorectal. Contrairement aux souris *Il10^{-/-}*, les souris *Il10^{-/-} Myd88^{-/-}* traitées par AOM ne développent pas de tumeurs colorectales, indiquant que la signalisation bactérienne via le système TLR/MYD88 est requise pour le développement de la CAC. Uronis tout comme Rakoff-Nahoum démontrent que la voie TLR/MYD88 est essentielle pour le développement de CAC induit par le microbiote [143].

Nous venons de voir que dans un contexte inflammatoire entraînant un déséquilibre de la flore intestinale, MYD88 favorise la cancérogenèse dans la CAC. À *contrario*, quand l'homéostasie intestinale est préservée Salcedo *et al.* démontre que *MYD88* joue un rôle anti-tumoral dans le développement de la CAC associé à l'azoxyméthane (AOM)/dextrane sulfate de sodium (DSS) [144]. En effet en 2010, ils démontrent que *MYD88* joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Malgré le fait que les souris *Myd88^{-/-}* soient viables et qu'elles se comportent normalement en l'absence d'infection, elles présentent une susceptibilité accrue aux CAC. De plus elles présentent, par rapport au WT, une létalité nettement plus élevée, des scores cliniques et histologiques plus élevés et plus sévères, ainsi qu'une ulcération et une inflammation sévère. Contrairement à Uronis les auteurs

suggèrent que via la signalisation MYD88, le système immunitaire inné dans l'intestin joue un rôle protecteur important du CAC. Pour cela, ils s'appuient sur les données retrouvées dans la littérature suggérant que la reconnaissance des bactéries commensales lumineales par les TLR est cruciale pour la régénération des cellules épithéliales du côlon après une lésion par DSS [132] [145]. Ils en concluent que MYD88 intervient dans la régénération cellulaire, la survie des entérocytes et le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale via NF-κB. Les auteurs suggèrent que MYD88 protège contre le développement de polypes coliques dans le modèle AOM/DSS de CAC puisque les souris déficientes pour un seul TLR n'ont jamais montré une incidence accrue de polypes induits par l'AOM/DSS comme observé chez les souris *Myd88*^{-/-} à l'exception possible du déficit en TLR2 [144] [146][147].

En effet, Wang *et al.* 2018 ont rapporté que les souris déficientes en TLR4 ont une sensibilité à la colite similaire à celle des souris *Myd88*^{-/-}, mais, contrairement à ces dernières, elles sont résistantes au cancer colorectal associé à la colite ulcéreuse. [148]

L'ensemble de ces données suggèrent que MYD88 joue un rôle ambivalent dans le cancer colorectal, à savoir un rôle pro-tumoral qui maintient un environnement inflammatoire au niveau de la tumeur et un déséquilibre de la flore intestinale pour induire l'invasion tumorale et l'auto-renouvellement des cellules tumorales, et le rôle anti-tumoral qui aide à maintenir l'homéostasie hôte-microbiote pour induire un arrêt du cycle cellulaire tumoral et des réponses immunitaires contre les cellules cancéreuses.

4.4. Étude de l'impact de la surexpression de MYD88

De nombreuses études issues de données de patients rapportent qu'une surexpression de *MYD88* a été trouvée dans 80% des cancers colorectaux, 83% des cancers de la prostate et 75% des cancers gastriques [129]. Cette augmentation d'expression a été confirmée en 2021 par Jingyao Chen *et al.* [149]. En effet, les auteurs montrent que l'expression *MYD88* est considérablement accrue dans les cellules cancéreuses gastriques par rapport aux cellules normales et plus particulièrement à un stade tardif de la maladie. Il a également été démontré que l'activation de la voie NF- κ B via le TLR2 impliquant MYD88 et MAL joue un rôle prépondérant dans l'inflammation.

À la vue de ces constatations, une attention particulièrement s'est portée sur les TLR2 et TLR4 en grande partie en raison de leur capacité à reconnaître la bactérie *H. pylori* [150]. Ainsi, il a été décrit qu'il existait une expression accrue de ces derniers dans les biopsies tissulaires enflammées de gastrite et de cancer gastrique [151] [152]. *MYD88* étant directement associée au TLR2, il en découle que l'augmentation de l'expression du gène *TLR2* est à l'origine de l'augmentation de l'expression de *MYD88* du fait de leur interaction. Les auteurs suggèrent qu'un gain d'expression de *MYD88* dans les cancers gastriques jouerait un rôle dans la pathogenèse du cancer en activant les fonctions oncogéniques de *MYD88* [151] [152]

Dans les cancers hépatiques comme dans les cancers gastriques, cette surexpression de *MYD88* hépatique est retrouvée chez les patients présentant un tableau clinique défavorable auquel est associée une prolifération métastatique des cellules hépatiques [128] [153]. Les auteurs émettent l'hypothèse que la surexpression de *MYD88* pourrait être induite par la stimulation par le LPS, l'IL-1 α et IL-1 β . De plus, au cours de leur recherche Beibei Liang *et al.* ainsi que Seth Rakoff-Nahoum ont montré que l'expression de *MYD88* était significativement plus élevée dans les tumeurs hépatiques que dans les tissus adjacents non tumoraux et en particulier au stade tumoral tardif de la maladie [141] [154].

L'ensemble de ces données décrit les multiples facettes de l'activité de *MYD88*, se situant en particulier à l'interface entre l'inflammation et la transformation cellulaire. Mais, ces données montrent qu'en fonction du contexte environnemental cela conduit à un effet pro- ou anti-tumoral de *MYD88*. Ces données, obtenues à partir de divers modèles, confortent l'hypothèse que la surexpression de *MYD88* est impliquée dans la progression tumorale métastatique via une signalisation dépendante des TLRs et qu'elle peut servir de facteur pronostique dans de nombreux cancers solides puisqu'elle est retrouvée à des stades tardifs chez des patients dont le taux de survie est faible [154].

4.5. Étude de l'impact des mutations somatiques du gène *MYD88* dans les cancers

Les mutations de *MYD88* ont été rapportées dans plusieurs hémopathies malignes B. Ces mutations touchent à la fois des lymphomes agressifs (à évolution rapide, haut-grade) que des lymphomes indolents (à évolution lente, bas grade). 14 variants ont été décrits jusque-là [155]. Le variant L265P se distingue des autres variants (nommés ici, non-L265P) par sa fréquence d'apparition, sa localisation et ses fonctions.

4.5.1. Localisation des mutations *MYD88*

L'ensemble des mutations *MYD88* est retrouvé dans le domaine TIR, domaine indispensable pour son action au niveau des voies de signalisation situées en aval (cf. **Figure 21**) [155]. La mutation L265P est la plus fréquemment retrouvée et provoque le changement de l'acide aminé Leucine en position 265 en une Proline. Une autre mutation, M232T, affecte une Méthionine qui se trouve dans un feuillet adjacent et entre en contact avec la leucine affectée par L265P. Un groupe de mutations se trouve dans la « boucle B-B », une région conservée au cours de l'évolution qui médie les interactions du domaine TIR. Deux autres mutations, S222R et S243N, modifient une face adjacente du domaine TIR. Un seul mutant affecte le côté opposé du domaine TIR (T294P), modifiant le motif conservé « boîte 3 » qui est important dans la signalisation IL-113 [155] [156].

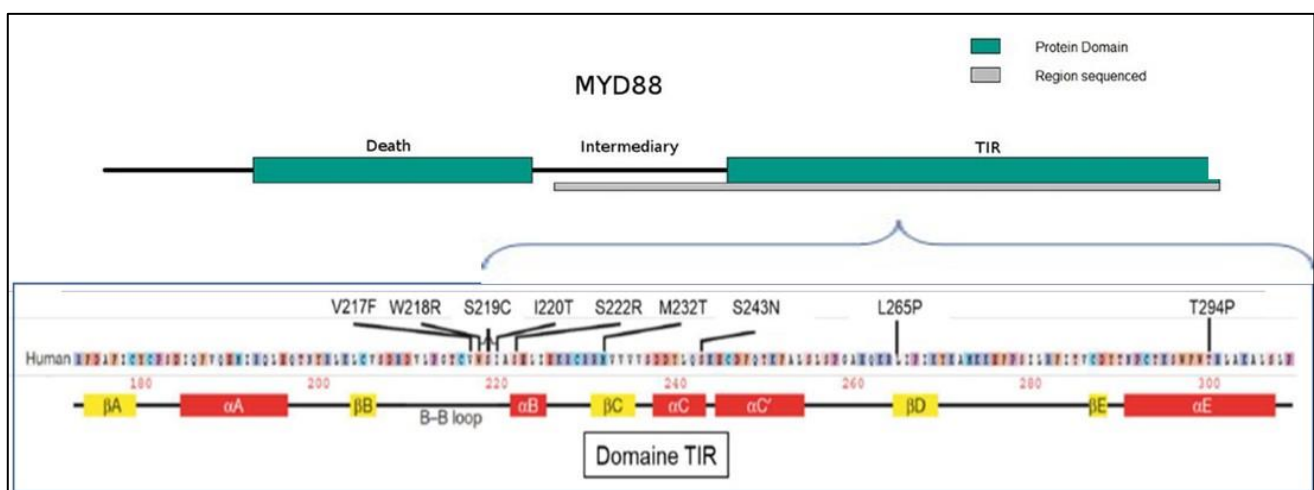


Figure 21 : Distribution des variants sur la séquence protéique *MYD88* humaine.

Ce graphique représente la protéine de *MYD88*, en utilisant le transcrit humain *MYD88 NM_002468.4* comme référence. Le domaine de la mort (DD) et le domaine du récepteur Toll/Interleukine 1 (TIR) sont indiqués par des rectangles bleus. La région séquencée par NGS est indiquée par une barre grise sous le graphique des protéines. Un zoom a été fait sur la région TIR, dans laquelle on retrouve la majorité des mutations. Figure adaptée d'après Ngo *et al.* [155].

4.5.2. Variant L265P

Le registre international du cancer accessible au public (AACR GENIE) ainsi que de nombreuses études décrivent la mutation *MYD88* L265P comme étant la plus représentée dans les lymphomes B. Plus de 90 % des cas de lymphomes lymphoplasmocytaires (LPL) ou maladie de Waldenström (MW) ont une mutation *MYD88* L265P, tandis que de rares cas de LPL ont des mutations non L265P [157] [158] [159]. Cependant, elle n'est pas spécifique du MW. En effet, cette même mutation est retrouvée dans 50 à 80% des cas de M-Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée IgM (MGUS-IgM) [155] puisque les MGUS IgM peuvent être considérée comme un état précoce du développement de la MW. On la retrouve également, chez 29% des patients atteints de lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL) [155]. Elle survient plus exactement chez les patients atteints de DLBCL de type ABC (Activated B-Cell) et est rare ou absente parmi les DLBCL de type GCB (Germinal Center B-cell) [160]. Elle est aussi retrouvée chez 2,9 à 4% des cas de de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) [161] [162], de même que dans 7 à 13 % des cas de lymphome de la zone marginale (LZM), [155] [157] [163][164]. Elle n'est par contre pas retrouvée dans le myélome multiple ni les MGUS IgG ou IgA [163][165].

La présence de la mutation somatique L265P au sein du domaine TIR engendre un changement de conformation favorisant une propension accrue à l'oligomérisation et à l'agrégation spontanée de myddosome. Ce changement de conformation stabilise l'homo-dimérisation de *MYD88*, étant crucial pour son interaction avec les protéines du myddosome en imitant l'effet des domaines TIR dimérisés. Ceci a pour conséquence d'induire une activation constitutive des voies de signalisation situées en aval de *MYD88* et de favoriser ainsi la croissance maligne par le biais notamment de l'activation constitutive du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) [166].

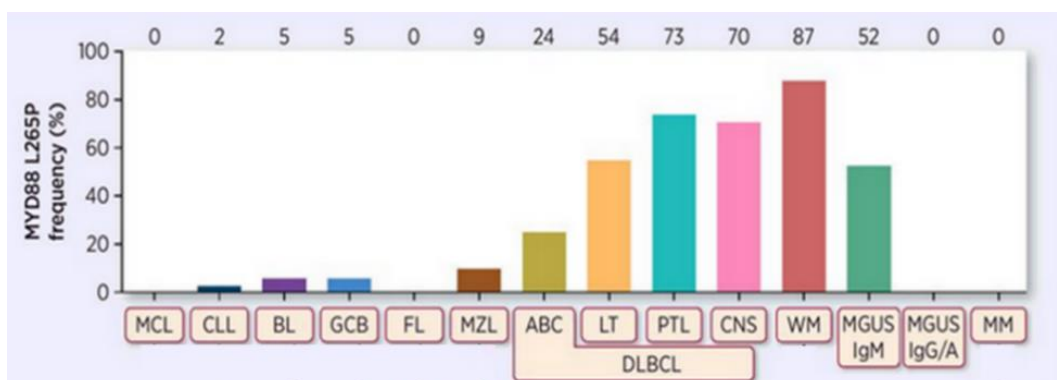


Figure 22 : Diagramme de fréquence d'apparition de la mutation *MYD88* L265P dans différents lymphomes d'origine B.

MCL, lymphome du manteau; CLL, leucémie lymphoïde chronique; BL, lymphome de Burkitt; GCB = GCB-DLBCL, lymphome B diffus à grande cellules de type centre germinatif; FL, Lymphome Folliculaire; MZL, lymphome de la zone marginale; DLBCL ABC, lymphome B diffus à grande cellules de type activé, PTL, lymphome testiculaire primitif ; LT, DLBCL cutané Type Jambe ; CNS, DLBCL du système nerveux central ; WM, Magroglobulémie de Waldenström , MGUS, Gammopathie monoclonale de signification indéterminée; MM, myélome multiple. Figure adaptée d'après [165].

4.5.3. Autres mutations

Alors que la MW est majoritairement caractérisée par la présence de la mutation L265P, dans les autres lymphomes on retrouve une plus grande variabilité de mutations mais cela reste en général à une moindre fréquence.

Ngo *et al.* et Dubois *et al.* ont décrit plusieurs mutations *MYD88* (L265P, S243N, S219C, V217F, M232T, R264L, S222R, V144A, P258L, V147I, I220T, P141T, Q143L et T294P) chez les patients atteints de DLBCL [156]. Suivant les études, ces 14 variants sont retrouvés dans les proportions suivantes L265P (62.5% à 65.0%, des cas), S243N (13,3% à 13,5%, des cas), S219C (8,3%, des cas), P258L (1% à 6,7%, des cas), V217F (1,7% à 3,1%, des cas), M232T (absente à 3,1%, des cas), R264L (absente à 2,1%, des cas), F283V (1,7%, $n = 1$), P141T (1% à 1,7%, $n = 1$). En ce qui concerne les autres variants ils sont retrouvés dans des proportions inférieures à 1% [167] [156].

L'AACR GENIE référence la mutation V217F dans environ 0,9% des cas des leucémies lymphoïdes, les autres variants sont présents dans moins de 0,1% lymphomes du manteau et les LLC (*cf. Figure 23*).

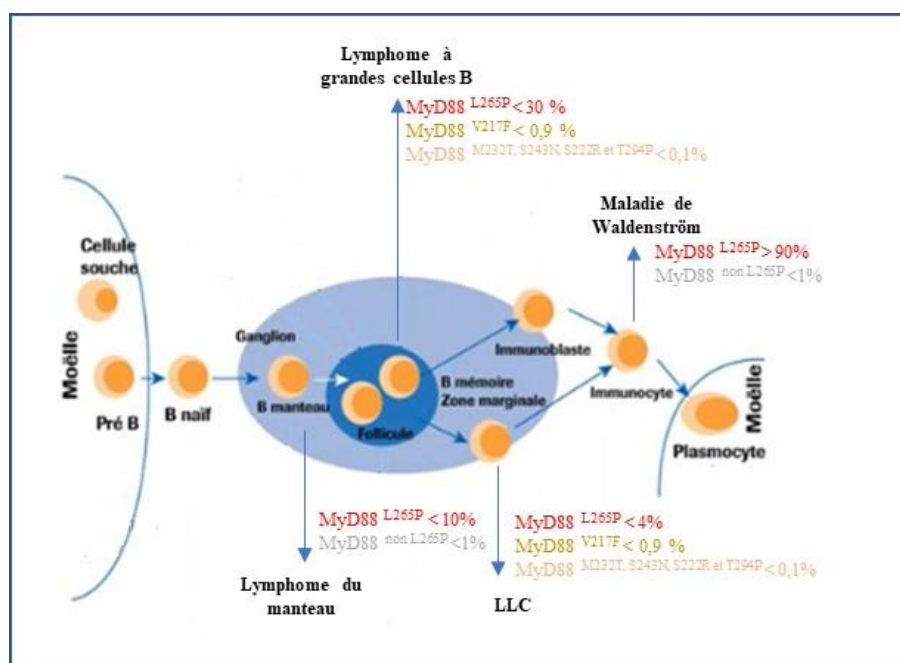


Figure 23 : Schéma montrant les mutations MYD88 caractérisées dans les lymphomes non hodgkiniens B.

La mutation L265P est majoritairement représentée dans la MW contrairement aux autres lymphomes où les mutations sont plus variables.

En terme de fonction, les variants L265P, M232T et S243N activent fortement la voie NF- κ B et JAK-STAT3 [168]. Ces variants régulent positivement CD83 qui est une cible de NF- κ B. Les variants S222R et T294P activent eux aussi CD83 mais à des degrés divers. Par conséquent, ils activent plus modestement la voie NF- κ B [155].

4.5.4. L'impact de la présence de mutations somatiques *MYD88* dans les cancers et dans la surveillance immune

Le concept de surveillance immune tumorale, décrit par Paul Ehrlich puis repris par Burnet *et al.* en 1957, suggère que le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de la prolifération tumorale [169][170]. Afin de se développer au sein d'hôtes immunocompétents, il est impératif que les tumeurs développent plusieurs stratégies d'échappement immunitaire, telles que des mutations provoquant une perte d'antigène ou une altération de la machinerie de traitement et de présentation de l'antigène [171] [172]. D'autres mécanismes qui conduisent à l'évasion immunitaire ont également été identifiés dans le lymphome ; ils comprennent :

1. L'altération de l'infiltration des cellules immunitaires par des défauts endothéliaux,
2. L'inhibition de l'activation immunitaire par la sécrétion de médiateurs suppresseurs tels que le TGF- β et l'IL-10, [173]
3. L'altération des réponses anti-tumorales fonctionnelles par la régulation à la hausse de l'expression des gènes du point de contrôle immunitaire [174] [175].
4. Le recrutement local de cellules immunosuppressives telles que les cellules T régulatrices (Treg) et B (Breg), [176] [177] les macrophages associés aux tumeurs (TAM) [178], et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), [179] [180]

Au sein du laboratoire, de précédents travaux nous ont amené à émettre l'hypothèse que les cellules B qui suractivent NF- κ B ont un profil de cellules B régulatrices (Breg) [176]. Ces cellules B proliférantes empruntant la voie NF- κ B sont connues pour exprimer deux molécules immunosuppressives, IL-10 et PD-L1 [181]. Or l'un des points de contrôle le plus souvent dérégulé implique l'interaction du récepteur de mort programmée-1 (PD-1, CD279) à la surface des lymphocytes T avec son ligand mort-ligand-1 programmé (PD-L1) ou PD-L2, qui se trouvent à la surface des macrophages et de certaines cellules tumorales. Cette interaction délivre des signaux inhibiteurs qui provoquent finalement l'apoptose, l'anergie ou l'épuisement fonctionnel des cellules T impliquées [182]. Récemment, plusieurs études ont démontré qu'il y avait une surexpression de PD-L1 dans les cellules tumorales de LNH-B et une augmentation de l'expression de *PD-1* dans les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) [183] [184] [185] [186]. Cette surexpression de *PD-L1* peut être induite par *MYD88* mutée. En effet dans environ 30 % des DLBCL de type ABC exprimant la mutation *MYD88* L265P on retrouve une surexpression accrue de *PD-L1* [187]. *MYD88* L265P provoque l'activation chronique de la voie JAK/STAT qui stimule à son tour l'expression de PD-L1. De plus, *MYD88* muté active AP-1 (via les composants c-Jun/Jun-B) qui activent l'expression de PD-L1 [188] [189] [190].

Ainsi, le traitement avec des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire ciblant PD-1/PD-L1, seul ou en combinaison avec d'autres inhibiteurs de point de contrôle immunitaire, peut restaurer la fonction effectrice des cellules T [191] et apparait comme étant une stratégie prometteuse pour le traitement des hémopathies malignes, en particulier chez patients atteints d'un lymphome hodgkinien réfractaire[192] [193] et d'autres LNH agressifs [194] [195].

Chapitre 5 : Les Lymphomes non Hodgkiniens à cellules B présentant la mutation *MYD88 L265P*.

5.1. Présentation générale sur les lymphomes

En France, parmi les hémopathies malignes les lymphomes représentent la moitié des cas ce qui correspond à 6 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancer. Quel que soit l'âge, le sexe ou les origines, les lymphomes ont la particularité de pouvoir se déclarer tout au long de la vie. Le lymphome est un cancer qui se développe à partir d'une prolifération de lymphocytes malins au sein d'un organe lymphoïde secondaire tel que la rate, les **ganglions lymphatiques** ou dans d'autres organes tels que le tube digestif, la peau ou le cerveau. Il existe deux types de lymphomes :

- Le lymphome hodgkinien ou maladie de Hodgkin
- Les lymphomes non hodgkiniens.

La **maladie de Hodgkin** a été décrite par le médecin britannique Thomas Hodgkin en 1832, elle touche en particulier des sujets âgés de 20 à 40 ans. Cette maladie est caractérisée par la présence de la cellule de Reed Sternberg. Ces cellules dérivent d'un lymphocyte B mais sont incapables de synthétiser des Ig. Cette maladie représente 15 % des lymphomes.

Les **lymphomes non hodgkiniens (LNH)**, eux, sont retrouvés plus fréquemment chez les personnes de plus de 60 ans. Le groupe des LNH regroupe plus de 80 pathologies malignes différentes. Afin de mieux les classer ces pathologies sont répertoriées en deux sous-types de lymphomes :

- **Les lymphomes de type B (LNHB)**, qui se développent à partir de lymphocytes B. Ils représentent 85 % des cas de lymphomes non hodgkiniens ;
- **Les lymphomes de type T (LNHT)**, qui se développent à partir de lymphocytes T. Ils représentent 15 % des cas de lymphomes non hodgkiniens.

Les LNHB peuvent être classés selon leur degré d'évolution [196]. Les lymphomes agressifs, représentant 50 à 60 % des LNHB. Ils sont caractérisés par une présentation clinique symptomatique à évolution rapide en raison d'un index prolifératif élevé. A l'inverse, les LNHB indolents sont souvent asymptomatiques. Ils présentent une faible activité proliférative leur conférant une progression plus lente. Par conséquent ils peuvent mettre des années à évoluer. Ils représentent 40 à 50 % des LNHB.

Parmi les LNHB, on distingue 2 grandes catégories selon leur degré d'évolution : les lymphomes agressifs et indolents à part le LNH B du manteau dit de malignité intermédiaire.

Je vais ici présenter les LNHB présentant la mutation somatique *MYD88 L265P*.

5.2. Les LNH-B présentant la mutation *MYD88* L265P

Même si la mutation *MYD88* L265P est majoritairement retrouvée dans la MW, elle n'est pas spécifique de cette maladie. En effet, on la retrouve dans le lymphome du manteau, le lymphome de la zone marginale et la leucémie lymphoïde chronique. La fréquence d'apparition de la mutation dans ces lymphomes est néanmoins inférieure à 10% ce qui suggère que *MYD88* joue un rôle marginal dans l'apparition de ces lymphomes. En réalité, en dehors de la MW, la mutation *MYD88* 265P est le plus souvent retrouvée dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé (DLBCL- ABC).

C'est la forme de DLBCL la plus couramment rencontrée chez les adultes, elle représente 3% de l'ensemble des cancers [197]. En France, ce cancer survient principalement chez les personnes âgées, avec un âge médian au diagnostic d'environ 70 ans, [198] bien qu'il puisse survenir chez les jeunes adultes et, dans de rares cas, chez les enfants [199]. Le premier signe de cette maladie est caractérisé par la présence d'une masse ou d'une infiltration tissulaire à croissance rapide qui est parfois associée à des symptômes systémiques B, par ex. fièvre, perte de poids et sueurs nocturnes. Ces masses sont retrouvées dans les ganglions, en extra ganglionnaire, dans le médiastin ou dans le système nerveux central. L'analyse histologique des tumeurs révèle la présence d'une prolifération diffuse de lymphocytes atypiques de taille moyenne à grandes cellules qui peuvent ressembler à des cellules centroblastiques, immunoblastiques, ou néoplasiques.

Les DLBCL peuvent être caractérisés par leur localisation, leur morphologie ou leur profil d'expression génique [200]. Des analyses transcriptomiques réalisées sur les DLBCL ont permis de distinguer deux sous-types : des DLBCL de type Centre Germinatif (Germinal Center, GC-Like) avec une signature transcriptionnelle comparable à celle des cellules B Centre Germinatif et des DLBCL de type B post-centre germinatif qui sont en transition vers la différenciation plasmocytaire (Activated B-Cell) dont la signature est comparable à celle de lymphocytes B activés périphériques [201].

Ces deux sous-types se distinguent également par une différence au niveau de la survie globale après un traitement standard [202] [203] [190]. Alors que les patients atteints de DLBCL de type GCB à un taux de survie à 5 ans de 70 à 80% avec une approche combinée de l'anticorps anti-CD20 rituximab et de chimiothérapie, plus de 50 % des patients DLBCL de type ABC succomberont à leur maladie à 5 ans en dépit du traitement [202] [204]. Diverses voies oncogéniques sont dérégulées dans le DLBCL de type GCB ce qui contribue à la pathogenèse moléculaire de cette entité. Dans les DLBCL de type GCB la translocation t(14;18) juxtaposant le gène *BCL2* et le locus IgH conduit à une activation constitutive de la protéine anti-apoptotique *BCL2* [205]. Une autre caractéristique de la biologie du DLBCL de type GCB est la dérégulation de la voie de signalisation de la phosphatase et de l'homologue de la tensine (PTEN) – phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), entraînant des processus cellulaires tels

que la prolifération, la survie cellulaire et la croissance cellulaire [206][205]. Les DLBCL de type GCB sont en outre caractérisés par un gain ou une amplification de c-Rel et de *MDM2* qui est un régulateur négatif du suppresseur de tumeur p53, ainsi que des délétions des gènes suppresseurs de tumeur connus *TP73* et *ING1* conduisant à une instabilité génomique [203] [207] [208] (cf. **Figure 24**).

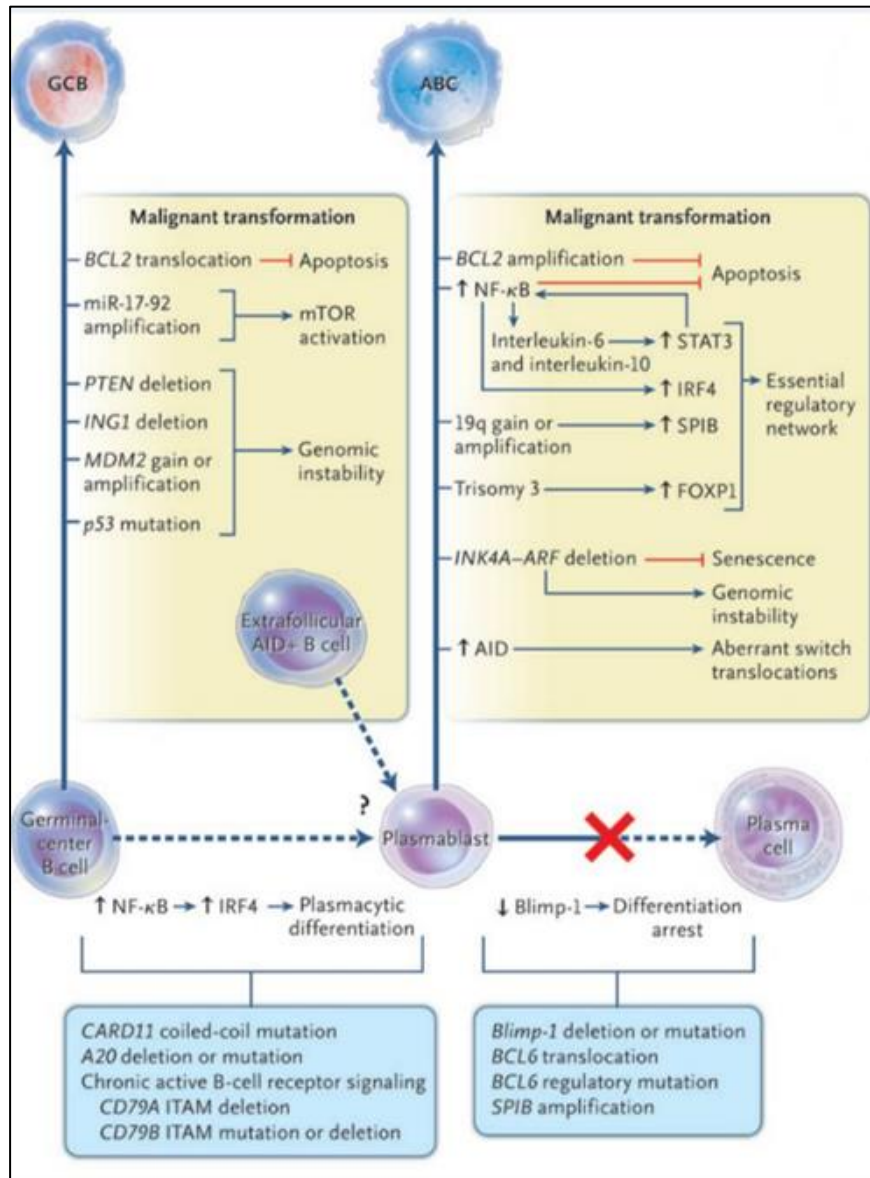


Figure 24 : Voies oncogéniques présentes dans les deux sous-types de lymphome diffus à grandes cellules B.

Sur la base du profil d'expression génique, le lymphome B diffus à grandes cellules peut être divisé en deux sous-types moléculaires : le sous-type de type B à centre germinatif (GCB), et le sous-type de type B activé (ABC). Ces sous-types proviennent de divers stades de différenciation des cellules B et acquièrent des anomalies oncogènes distinctes. Les anomalies répertoriées sont préférentiellement ou exclusivement observées dans les sous-types indiqués. Les lignes bleues indiquent l'activation et les lignes rouges indiquent l'inhibition d'après Lenz et Staudt [208].

Contrairement aux DLBCL de type GC, 30% des DLBCL de type activé possèdent la mutation *MYD88* L265P. Les profils d'expression génique des échantillons de patients DLBCL de type ABC suggèrent que ce sous-type est dérivé de cellules B en train de se différencier en plasmocytes [205]. Au niveau moléculaire on retrouve une surexpression de nombreux gènes exprimés dans les plasmocytes [209]. Plus précisément, les DLBCL de type ABC surexpriment *XBP-1* et *IRF-4*, deux régulateurs clés du phénotype sécrétoire des plasmocytes [210]. Cependant, la différenciation plasmocytaire terminale est bloquée par différentes anomalies génétiques ; telles que des translocations aboutissant à la dérégulation de *BCL6* et conduisant à l'inactivation de *PRDMI* qui code *BLIMP1* (facteur de transcription qui favorise la différenciation plasmocytaire en mettant fin à l'expression de la plupart des gènes de différenciation des cellules B matures) [211] [212] [213] [214][215] (cf. **Figure 24**). Enfin, 26 % des cas présentent un gain/amplification et une surexpression consécutive du facteur de transcription de la famille ETS *SP1B* qui réprime également l'expression de *BLIMP-1* [203][216]. Les DLBCL de type ABC sont caractérisés par des anomalies génétiques supplémentaires qui jouent un rôle important dans leur pathogenèse. Le locus suppresseur de tumeur *INK4A-ARF* est inactivé dans environ 30 % [203][217]. Une autre anomalie caractéristique est le gain ou l'amplification de 18q qui est associé à une surexpression de la protéine anti-apoptotique *BCL2* [218]. De plus, la trisomie 3 est fréquemment détectée [203][218]. *FOXP1* est impliqué dans l'oncogenèse du le lymphome du MALT et des DLBCL [203] [219] [220].

Une autre caractéristique pathogénique des DLBCL de type ABC est l'activation constitutive de la voie de signalisation NF- κ B [221]. Cette activation constitutive de la voie NF- κ B est attribuée dans environ 10 % des cas à des mutations activatrices de *CARD11*, [222] dans environ 20% des cas à des mutations dans les molécules de signalisation du BCR, *CD79B* et moins fréquemment dans *CD79A* [221]. Chez un tiers des patients atteints de DLBCL de type ABC, l'activation constitutive de la voie NF- κ B est attribuée à l'inactivation biallélique du régulateur négatif du NF- κ B *A20* [223] [224] et dans 30% des cas cela est dû à la présence de la mutation *MYD88* L265P qui médie la signalisation des TLRs et du récepteur à l'interleukine-1 [155] (cf. **Figure 24**).

D'autres lymphomes tels que le DLBCL cutané de type Jambe ; le lymphome testiculaire primitif et le DLBCL du système nerveux central présentent une fréquence d'apparition de la mutation *MYD88* élevée. Ces lymphomes, ayant pour origine commune un DLBCL de type ABC, présentent eux aussi un engagement partiel avec blocage de la différenciation plasmocytaire terminale et activation de NF- κ B.

5.3. La Maladie de Waldenström

La MW est actuellement définie comme un syndrome lymphoprolifératif B caractérisé par une infiltration lymphoplasmocytaire envahissant la moelle osseuse associée à la présence d'un pic monoclonal circulant d'isotype IgM. Cette hémopathie reste à l'heure actuelle incurable [225].

Le plus souvent, la découverte de la MW est fortuite, car la majorité des personnes atteintes par cette pathologie ne ressent aucun signe de la maladie. En 1944, le professeur Jan Gösta Waldenström décrit dans la revue *Acta Medica Scandinavica* [226] les principaux signes cliniques observés. Il s'agit d'une hépatosplénomégalie, une lymphadénopathie, des symptômes constitutionnels (fièvre, sueurs nocturnes, les maux de tête), d'hémorragies nasales et buccales. Il observe également la présence d'une anémie normochrome associée à une thrombocytopenie, une hypofibrinogénémie, une vitesse de sédimentation augmentée, une hypoalbuminémie et une infiltration médullaire par des lymphocytes. À la différence des cas de myélome multiple, également caractérisés par une infiltration plasmocytaire médullaire, aucune douleur osseuse ni aucune anomalie radiographique ne sont relevées. Il met en évidence, la présence en excès d'une globuline de haut poids moléculaire. Celle-ci migre dans la zone correspondant aux γ -globulines à l'électrophorèse des protéines sériques. Cette accumulation de globuline est caractéristique d'un cancer plasmocytaire, dans lequel un clone unique de plasmocytes produit et sécrète une quantité excessive d'un certain type d'anticorps ici l'IgM.

5.3.1. Épidémiologie

La MW est une affection rare, représentant 1 à 2% des hémopathies malignes et 6 % des syndromes lymphoprolifératifs en France. Son incidence est estimée à 3 nouveaux cas par million d'habitants chez les hommes et 1 nouveau cas par million d'habitants chez les femmes. L'âge médian au moment du diagnostic est de 73 ans, avec une prédominance masculine (ratio homme/femme : 2/1) [227] [228]. Sa fréquence d'apparition est plus élevée chez les sujets Caucasiens que chez les sujets Afro-Américains. En effet, seuls 5 % des patients sont Afro-Américains [225][229][230]. La survie médiane est de plus de 10 ans pour les sujets de moins de 70 ans, 6 ans pour ceux âgés de 70 à 79 ans et de 4 ans pour ceux de plus de 80 ans. Chez les patients atteints de MW, la mortalité est imputable à la maladie dans seulement 28% des cas. Parmi les causes de décès les plus fréquentes, on retrouve les tumeurs solides (20,1%), les incidents cardiaques (14,5%) et 28,6% d'entre elles ne sont pas connues [227].

5.3.2. Diagnostic

La MW est un lymphome indolent d'évolution lente qui se présente sous deux formes :

- **Une forme asymptomatique**, le patient présente une accumulation d'IgM dans le sang avec une infiltration médullaire inférieure à 10%. À ce stade on parle de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS à IgM). Le MGUS est utilisé pour définir un état précoce symptomatique de la MW. Aucun traitement n'est prodigué à ce stade. En revanche, une surveillance médicale accrue est indispensable. Cette surveillance sans traitement peut durer plusieurs années. Sans que cela n'ait de retentissement sur la vie au quotidien.
- **Une forme symptomatique**, ce qui veut dire que le patient présente des signes d'évolution de la maladie, nécessitant la mise en place d'un traitement. Les symptômes les plus fréquemment retrouvés sont :
 - L'anémie arégénérative normocytaire ou faussement macrocytaire avec présence d'hématies en rouleaux.
 - Une augmentation de la vitesse de sédimentation liée à la présence d'un taux IgM trop élevé dans le sang associé à des signes de mauvaise tolérance ou liés à une activité auto-immune de l'IgM (atteinte neurologique sévère, saignements, etc...).

L'accumulation d'IgM révélée par la technique d'électrophorèse des protéines sériques ainsi que l'augmentation de la vitesse de sédimentation sont des éléments qui oriente le diagnostic en faveur d'une macroglobulinémie. Cependant, afin de poser un diagnostic définitif il est nécessaire d'effectuer un examen complémentaire. En effet, le pic IgM n'est pas restreint à la MW, il est retrouvé dans d'autres pathologies tels que les rares cas de myélome multiple à IgM, ou les lymphomes ZMS, ainsi que des affections rhumatologiques. Afin de déterminer le taux d'infiltration lymphoplasmocytaire au niveau de la moelle osseuse, il est nécessaire d'effectuer un myélogramme.

Dans le cas de la MW, les résultats des myélogrammes, montrent une infiltration médullaire variable représentant 10 à 100 % des cellules médullaires au sein de laquelle il est fréquent d'observer la présence de mastocytes (*cf. [figure 25](#)*). Dans 21 % l'atteinte médullaire est caractérisée par un infiltrat nodulaire, diffus et/ou interstitiel, constitué de petits lymphocytes prédominants associé à des lymphoplasmocytes et plasmocytes comme évoqués précédemment les mastocytes sont augmentés chez 26 % des patients [231].

Les mastocytes sont localisés dans les tissus conjonctifs et les muqueuses. Ces cellules peuvent être activées au cours de la réaction inflammatoire, pour libérer de l’histamine qui induit la vasodilatation, permettant ainsi le recrutement des neutrophiles et des macrophages. Ils peuvent aussi sécréter rapidement différents médiateurs hormonaux et des chimiokines, tels que le ligand inducteur de prolifération (APRIL) et CD40L, qui stimulent la différenciation lymphoplasmocytaire [232] [233] [234]. Ainsi, il semblerait que les mastocytes soutiennent l’expansion des cellules tumorales dans la MW via la signalisation CD154-CD40 [235].

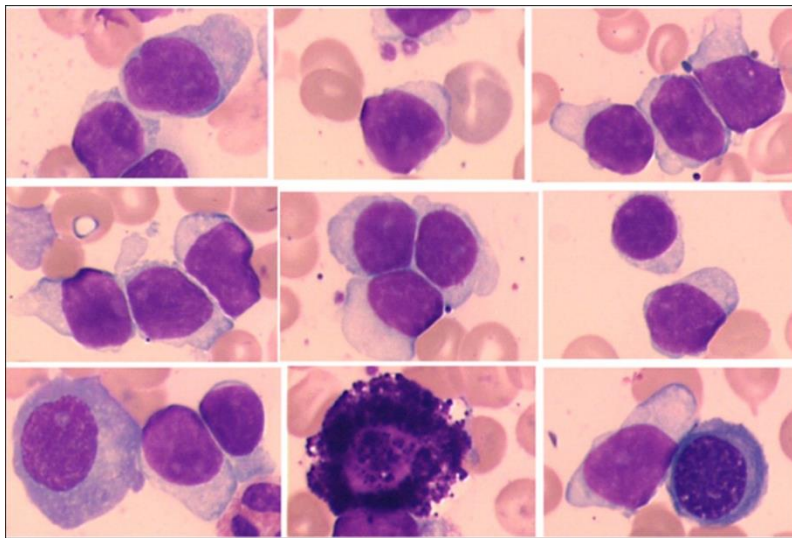


Figure 25: Infiltration lymphoplasmocytaire.

L’infiltration est caractérisée par une population lymphoïde polymorphe constituée de petits lymphocytes, lymphoplasmocytes, mastocytes et plasmocytes, avec une prédominance de petits lymphocytes. Issus du module de cours d’hématologie du Pr Jean Feuillard

Les cellules lymphoplasmocytaires apparaissent de façon aléatoire dans le sang périphérique. À contrario, il est fréquent d’observer la présence d’hématies en rouleaux sur le frottis sanguin.

Au niveau ganglionnaire, dans la majorité des cas on constate que l’architecture normale est partiellement conservée avec des sinus dilatés constitués parfois de petits centres germinatifs résiduels. Le ganglion est composé de petits lymphocytes, lymphoplasmocytes et plasmocytes d’aspect très similaire, ayant pour conséquence la formation d’une population de lymphoplasmocytes très homogène. On retrouve très peu de grandes cellules.

Dans la rate, on peut observer un infiltrat lymphoplasmocytaire formant des nodules dans la pulpe rouge ou se développant de façon plus diffuse.

Afin d’exclure tout autre type de lymphomes des études immunophénotypiques sont effectuées pour caractériser la MW. L’analyse par cytométrie en flux permet une évaluation plus approfondie des

déterminants antigéniques [200]. La MW est généralement caractérisée par l'expression des marqueurs CD19, CD20, CD22, CD24, HLA-DR, du marqueur CD200 dans 60 % des cas ainsi que par l'expression monotypique d'IgM de surface, restreinte à la chaîne légère κ ou λ avec un ratio de $\kappa:\lambda$, égal à 5:1 [236]. Si l'on compare l'expression des marqueurs de lymphocytes B normaux matures avec les lymphocytes B de la MW on constate que l'expression du CD22 est constamment plus faible qu'ils sont positifs pour FMC7 et CD25 dans 70% et 66% des cas. Ils n'expriment pas le CD305 [237], le CD11b, le CD11c [236] [238], le CD5, le CD23, le CD103 et le CD10. Ces absences d'expression permettent d'écarter du diagnostic la leucémie à tricholeucocytes et le lymphome folliculaire où les lymphocytes B sont CD11b⁺ et CD11c⁺ ainsi que les cas de LLC où les lymphocytes sont CD5⁺ et CD23⁺. Le CD38 est présent dans la moitié des cas de MW mais l'expression est plus faible que celle observée sur les progéniteurs lymphoïdes B et les plasmocytes. Les lymphocytes B de la MW expriment de manière hétérogène l'antigène CD27, le CD79b et le CD81 chez plus de la moitié des patients et ils sont caractérisés par un continuum d'expression du marqueur CD138. [236] [238] [239]. De plus, les lymphocytes B de la MW sont CD25⁺ et CD103⁻ ce qui les différencie des lymphomes de la zone marginale. De plus, [240] *BCL2* et *PAX5* présentent respectivement une immunoréactivité cytoplasmocytaire et nucléaire, ce qui nécessite de les évaluer par immunohistochimie sur des coupes tissulaires [241].

Plusieurs études de génomique de patients MW révèlent la présence dans 90% des cas de la mutation *MYD88* L265P [242][243]. Ainsi la fréquence d'apparition de la mutation L265P rend cette maladie génétiquement distincte des autres lymphomes.

L'implication de cette mutation est confirmée par des études de protéomique mettant en évidence, la dérégulation de nombreuses voies de signalisation situées en aval de *MYD88* telles que les voies MAPK et NF- κ B. L'ensemble de ces données met en évidence une dérégulation de l'expression de différentes cyclines et d'histones désacétylases ainsi que des protéines impliquées dans le *homing* et la migration [244].

En résumé le diagnostic de cette hémopathie lymphoïde repose sur plusieurs critères définis lors du second Workshop International de la MW qui s'est tenu en 2003 : [240]

- Présence d'une IgM monoclonale sérique, quelle que soit sa concentration.
- Infiltration médullaire par de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire observée lors de la biopsie selon le stade de la maladie
- Profil immunophénotypique : Ig de surface de type M, CD5^{+/-}, CD10⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻, CD25⁺, CD27⁺, FMC7⁺, CD103⁻, CD138⁺
- La présence d'une mutation L265P sur le gène *MYD88*.

5.3.3. Classification

Deux systèmes de classification de la MW existent, l'un dit « de consensus » défini en 2002 par un groupe de travail international spécialiste de la MW, le second dit « originel » par l'équipe de la Mayo Clinic. (cf. **Tableau I**). Dans les deux cas, la MW symptomatique est définie comme étant un lymphome lymphoplasmocytaire infiltrant la moelle osseuse, avec un pourcentage supérieur ou égal à 10% [245], associé à la présence d'une immunoglobuline monoclonale d'isotype IgM. La MW est classée dans la catégorie des hémopathies lymphoïdes de bas grade de phénotype B, de type lymphomes lymphoplasmocytaires [246].

La classification consensus distingue les Macroglobulinémies de Waldenström symptomatiques et asymptomatiques. Dans les deux cas, elle n'exige pas de pourcentage d'infiltration médullaire ni de tau d'IgM monoclonale minimum. Le diagnostic de la MW peut donc être posé, quel que soit le taux de l'IgM monoclonal du moment qu'un infiltrat médullaire de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire est présent [240].

En revanche, **la classification originelle** différencie les Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée d'isotype IgM (MGUS) des Macroglobulinémies de Waldenström à progression lente (SWM pour smoldering Macroglobulinémies de Waldenström) de la même façon que pour le myélome multiple, car elle reflète des différences de pronostic. En effet, les SWM sont définies cliniquement comme ayant une infiltration lymphoplasmocytaire de la moelle osseuse, mais ils ne présentent aucun signe de lésion des organes cibles (d'anémie, symptômes constitutionnels, hyperviscosité, lymphadénopathie ou hépatosplénomégalie) [245]. Cependant, ils possèdent un risque de transformation en MW symptomatique dix fois supérieur à celui des MGUS d'isotype IgM. Cette classification définit un seuil à 3g/dL d'IgM monoclonale et à 10% d'infiltration lymphoplasmocytaire de la moelle osseuse pour différencier une MGUS d'isotype IgM d'une SWM lorsque le patient ne présente aucun signe clinique [245].

Consensus classification	
Symptômes	Pathologie
Présence IgM mais absence d'infiltrat médullaire de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire	Ig-MGUS
Traitement effectué en absence de symptômes dès la présence d'IgM et d'infiltrat de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire dans la moelle osseuse quel que soit leur proportion.	Maladie de Waldenström asymptomatique
Traitement effectué en présence de symptômes tels qu'une hyperviscosité lié à l'augmentation du taux IgM, ganglions lymphatiques volumineux, neuropathie ou amylose ou de lésions des organes terminaux en plus de la présence d'IgM et d'infiltrat de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire dans la moelle osseuse.	Maladie de Waldenström symptomatique
Originale classification	
Symptômes	Pathologie
Taux IgM < 3g/dL ou un taux d'infiltrat médullaire de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire < 10% dans la moelle osseuse, sans aucun symptôme ni signes de la maladie ni lésions au niveau d'autres organes	Ig-MGUS
Taux IgM > 3g/dL ou un taux d'infiltrat médullaire de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire > 10% dans la moelle osseuse, sans aucun symptôme ni signes de la maladie ni lésions au niveau d'autres organes	Maladie de Waldenström asymptomatique
Traitement effectué en présence de symptômes tels qu'une hyperviscosité lié à l'augmentation du taux IgM, ganglions lymphatiques volumineux, neuropathie ou amylose ou de lésions des organes terminaux en plus de la présence d'IgM et d'infiltrat de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire dans la moelle osseuse.	Maladie de Waldenström symptomatique

Tableau I: Diagnostic différentiel de la gammapathie monoclonale d'importance indéterminée [242]

5.3.4. Etiologie et physiopathologie

L'étiologie exacte de la MW est inconnue. Cependant, un consensus semble se dégager. Les cellules tumorales ont une différenciation clonale ayant pour conséquence la génération de petits lymphocytes exprimant des IgM de surface, des lymphoplasmocytes et des plasmocytes avec des IgM intracytoplasmiques. De nombre d'études épidémiologiques révèlent un risque accru de MW associé à des antécédents personnels de maladies auto-immunes (sclérodermie, lupus érythémateux, syndrome de Sjögren, anémie hémolytique auto-immune, polyarthrite rhumatoïde et maladie de Horton) et infectieuses (infection par le VHC, pneumonie, septicémie, pyélonéphrite, sinusite, herpès zona et grippe) allergiques et inflammatoires [247] [248]. Le lien observé entre la MW et les infections/maladies auto-immunes suggère l'implication éventuelle d'une perturbation du système immunitaire comme événement initial du développement de la MW [249]. La stimulation chronique des lymphocytes B dans ce contexte pourrait favoriser la survenue d'événements mutationnels à l'origine de la transformation tumorale, conduisant au développement de la MW. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les cellules B tumorales de MW portent des mutations somatiques IGHV, suggérant que ces cellules proviennent de lymphocytes B qui ont subi une stimulation antigénique répétée et une sélection dans le centre germinatif des follicules lymphoïdes [250]. En effet, plusieurs études suggèrent qu'il existe, dans la MW, une sureprésentation de la famille IGHV3-23. L'analyse du statut mutationnel des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (VH) a montré une hypermutation des gènes VH (avec une prédominance des réarrangements de la famille Vh3 et en particulier VH3-23) et du gène IGJ4 suggérant l'existence d'un processus de sélection antigénique. [251] [252] [253]. Dans la plupart des études, une absence de variation intraclonale est confirmée, à la différence de ce que l'on retrouve dans le lymphome B folliculaire par exemple. Plusieurs études suggèrent que les lymphocytes malins après avoir subi le processus d'hypermutations somatiques resteraient bloqués à ce stade et ne pourraient pas induire le processus de commutation [250][254][255]. En effet, à la différence des cas de myélome d'isotype IgM, la recherche d'événements transcriptionnels de commutation isotypique est négative (présence de transcrits μ ou $\mu + \delta$ et absence de transcrits α , γ ou ϵ) traduisant l'absence d'initiation du *switch* isotypique [251]. Le phénotype des cellules tumorales suggère que le clone est issu d'une cellule B post centre germinatif, hypothèse soutenue par l'analyse de la distribution des mutations somatiques des régions variables des chaînes lourdes et légères. De plus, l'étude du transcriptome des cellules tumorales met en évidence la présence d'anomalies, telles que la diminution de *ETS1* (*Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1*) et *FLII* (*Friend leukemia integration 1 transcription factor*), [256] responsable de la perturbation de l'expression des gènes *xbp1* (*X-Box Binding Protein 1*) et *ern1* (*Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1*) impliqués dans la différenciation plasmocytaire. Ces cellules ont ainsi un transcriptome

plus proche des lymphocytes B matures que des plasmocytes [242]. L'ensemble de ces données suggèrent que la prolifération tumorale pourrait être issue d'un lymphocyte B arrêté dans son processus de développement après son passage dans le centre germinatif, mais avant le stade de plasmocyte [257]. La MW pourrait ainsi avoir pour origine une cellule mémoire IgM+ et/ou IgM+IgD+ qui présenterait un déficit dans le processus d'initiation du *switch* isotypique [246][258] (cf. **figure 26**).

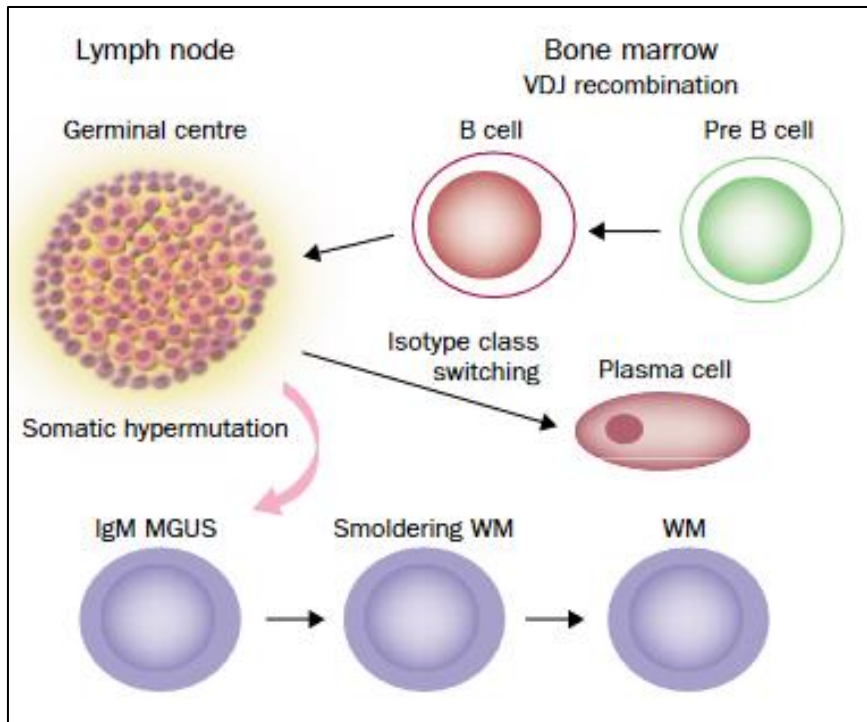


Figure 26 : Origine des lymphoplasmocytes de la MW

Les auteurs suggèrent que la MW proviennent de cellules qui ont subi le processus de somatique hypermutation au niveau du ganglion lymphatique, mais n'ont pas encore subi de commutation de classe d'après Ghobrial *et al.* [258]

Récemment, Roos-Weil *et al.* [259] a proposé une nouvelle approche de classification permettant de classer les MW soit en cellules B mémoire (MBC) soit en cellules plasmocytaires (PC). Cette étude de patterns de méthylation du génome a permis de classer les patients en deux sous-catégories (MBC et PC) en fonction des différences dans leurs signatures moléculaires. La catégorie MBC-WM est constituée de petits lymphocytes et caractérisée par la présence de la mutation *MYD88* L265P et *CXCR4* S338X. La catégorie PC-WM est quant à elle constituée de lymphocytes et de cellules plasmacytoïdes. Dans cette catégorie les altérations génomiques les plus couramment rencontrées sont la délétion sur le chromosome 6q, la surexpression de CD38, IGHV et des histones. Ces différences peuvent expliquer pourquoi certaine catégorie (MBC) sont résistantes aux différents traitements de la MW et peuvent permettre d'affiner le traitement (*cf. figure 27*) [259].

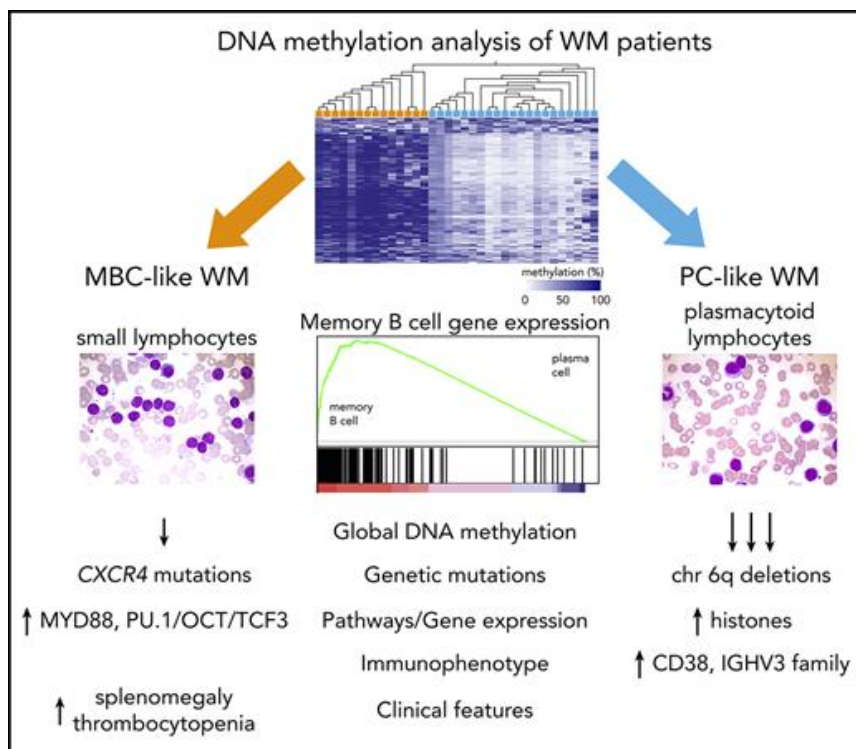


Figure 27 : Mise en évidence de deux sous-types MW

L'étude transcriptomique intégrant les signatures de méthylation établie à partir de 35 patients MW permet de classer en 2 sous-types les patients MW : un sous-type MW au profil MBC et un sous-type MW au profil PC normaux. Chacun de ces sous-types MW présentent des caractéristiques génétiques, phénotypiques et cliniques différentes. Le sous-type MW MBC regroupe plus de mutations clonales *CXCR4*, délétion 13q, et présente une splénomégalie et thrombocytopénie, alors que le sous-type MW au profil PC regroupe plus de délétion 6q, gain de 6p, possède des fréquences accrues de gènes IGHV3, une expression de CD38 et montre un profil caractéristique des plasmocytes d'après Roos-Weil et al. [259].

Les MGUS d'isotype IgM peuvent ainsi être considérées comme un état précoce de la MW, comme cela est observé pour les MGUS IgG et IgA dans le myélome multiple (MM) [260]. En effet, d'après les données de suivi à long terme de la Mayo Clinic (Rochester, E-U), un patient possédant des antécédents personnels de MGUS-IgM a un risque, associé à 1 à 1,5%, de développer une MW et a un risque supplémentaire, associé à 8,5%, de développer une LLC ou un autre syndrome lymphoprolifératif chronique B associé à une IgM [261] [262]. Ce risque est corrélé au composant monoclonal IgM mis en évidence lors du diagnostic et/ou lors du suivi des patients.

La maladie apparaît le plus fréquemment sous forme isolée bien qu'il existe des formes familiales [263]. En effet, il décrit dans la littérature que l'existence d'une MW ou d'un autre syndrome lymphoprolifératif chez les apparentés du premier degré est observée dans environ 20 % des cas de MW. Cette prévalence est inférieure à 1% dans la population générale et est comprise entre 3,2 et 6,3% dans les familles ayant des antécédents familiaux correspondant à la MW [264]. De plus, il a été rapporté que les patients avec des antécédents familiaux de MW ou de MGUS IgM déclarent plus précocement la maladie et ont un niveau d'infiltration médullaire plus important.

Jusqu'en 2021, l'ensemble des données retrouvées dans la littérature suggéraient que la prolifération tumorale pourrait être issue d'un lymphocyte B arrêté dans son processus de développement après son passage dans le centre germinatif, mais avant le stade de plasmocyte. Kaushal *et al.* [265] ont montré que la mutation *MYD88* L265P était présente dès les premiers stades de différenciation B (cellules pre-B), avant l'expansion du clone de cellules B malignes. En réalisant le profilage immunogénomique unicellulaire à haute dimension d'échantillons de patients MGUS et MW, ils montrent que la croissance du clone tumoral dans la MW est précédée d'une expansion de cellules B extrafolliculaires polyclonales (cellules B CXCR5^{neg}), d'une inflammation myéloïde et de dysfonctions immunitaires (baisse du compartiment T/NK, des lymphocytes B naïfs) au cours de la phase pré-néoplasique.

Dans cet article ils proposent un nouveau modèle dans lequel l'expansion aberrante de ces cellules B extrafolliculaires polyclonales crée un milieu favorable pour l'émergence de la MGUS.

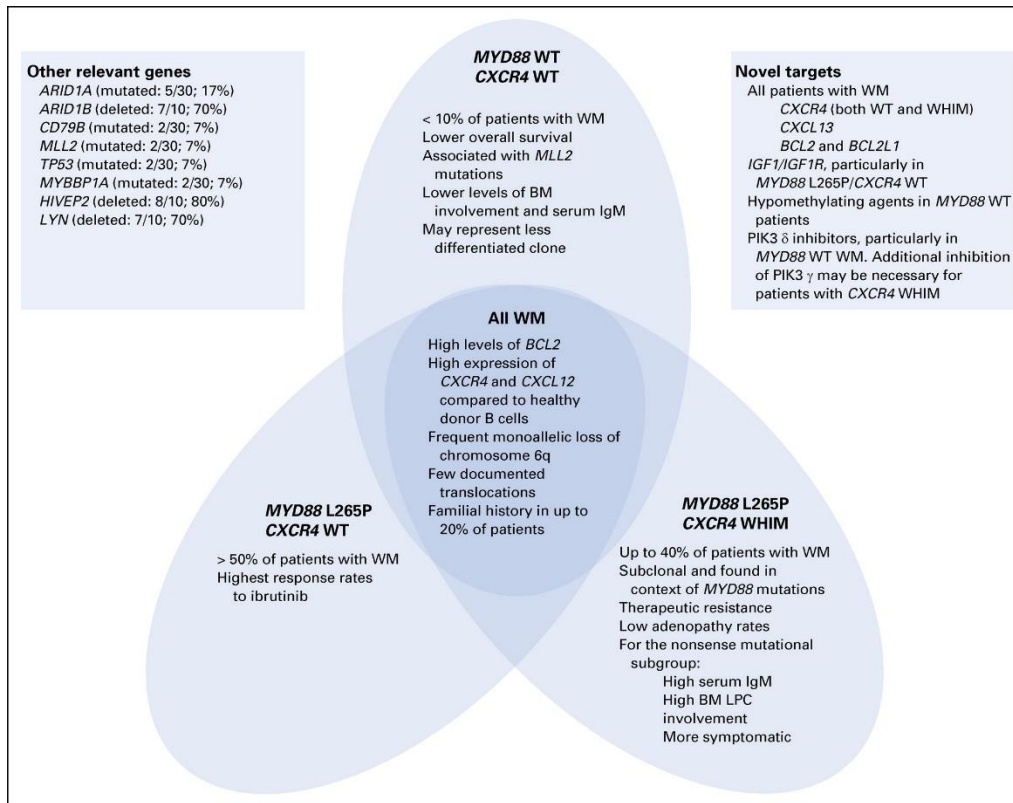


Figure 28 : Résumé des résultats d'anomalies génomiques retrouvées dans la MW.
 BM, moelle osseuse ; IgM, immunoglobuline M; LPC, cellule lymphoplasmocytaire ; WT, de type sauvage d'après Hunter et al. [266].

5.3.5. Les mutations autres que L265P dans la MW

En 2014, Hunter *al.* décrivent, deux ans après la découverte de *MYD88* dans la MW d'autres mutations ont été trouvées dans les gènes suivants : *ETV6* (60%), *CXCR4* (27%), *ARID1A* (17%), *MYBBP1A* (7%) et *CD79B* (7%) des cas. [159]

Ces données ont été complétées par l'étude parue en 2017, dans laquelle les auteurs décrivent d'autres gènes mutés tels que *MYBBP1A*, *TP53*, *MLL2*, *HIST1H1E* et *HIST1H1B* mais dans des proportions plus faibles [266](cf. **figure 28**).

Côté altérations chromosomiques, les délétions les plus fréquemment retrouvées au sein du chromosome 6q dans 40% et 60% des cas et 11q,13q,17q dans 20% des cas. Hunter *et al.*, dans une autre étude, démontrent que lorsque la migration cellulaire n'est pas imputée au récepteur membranaire *CXCR4*, et son ligand *CXCL12*, mais à une Altération du Nombre de Copies (CNA), cela implique les gènes : *PRDM2* (93 %), *BTG1* (87 %), *HIVEP2* (77 %), *MKLN1* (77 %), *PLEKHG1* (70 %), *LYN* (60 %), *ARID1B* (50 %) et *FOXP1* (37%)[159]. Les pertes de *PLEKHG1*, *HIVEP2*, *ARID1B* et *BCLAF1* constituaient les délétions les plus courantes au sein du chromosome 6.

Aux vues de ces constatations, la délétion 6q apparaît comme un bon candidat pour discriminer les patients MW des MGUS et peut servir de marqueur pronostique. Les autres délétions, tout comme la trisomie 4, 12 et 18 et les réarrangements IgH (caractéristiques du myélome à IgM) peuvent être utilisés pour différencier les cas de MW de ceux du myélome à IgM. *CXCR4* n'étant pas décrit dans d'autres pathologies à l'exception de quelques cas de MZL apparaît comme étant un bon candidat pour le diagnostic de la MW. *ARID1A* apparaît être un facteur de pronostic aggravant, puisque les patients présentant la combinaison mutationnelle *ARID1A* et *MYD88* L265P présentent un taux d'hémoglobine et de plaquette diminués et des atteintes au niveau de la moelle osseuse plus importantes [267].

Les patients présentant la combinaison mutationnelle *CD79B* et *MYD88* L265P ont un risque accru de voir leur pathologie évoluer en DLBCL de type ABC et ont une survie globale plus courte [268]. 3 à 10% des patients, ne possédant pas la mutation *MYD88* L265P, présentent un profil génétique fondamentalement différent de ceux présentant la mutation *MYD88*. Même s'ils sont peu nombreux, certains patients atteints de MW ne présentent pas de mutation au niveau de *MYD88*. Leur profil révèle alors des mutations activant la voie NF- κ B (*TBL1XR1*, *PTPN13*, *MALT1*, *BCL10*, *NFKB2*, *NFKBIB*, *NFKBIZ* et *UDRL1F*), (*KMT2D*, *KMT2C* et *KDM6A*) ou altérant la réparation des dommages à l'ADN (*TP53*, *ATM*, et *TRRAP*). Ces patients répondent faiblement à l'ibrutinib contrairement aux patients présentant la mutation *MYD88* L265P [266] (cf. **figure 28**).

5.3.6. Pronostic et traitement

La médiane de survie des patients atteints de MW est d'environ 5 ans. Les facteurs pronostiques adoptés de manière consensuelle sont l'anémie, la thrombopénie (qui reflète le degré d'infiltration médullaire), le taux d'IgM, le taux de β 2-microglobuline et l'âge. D'après la littérature :

Les patients asymptomatiques ne nécessitent pas d'être traités, une simple surveillance est recommandée.

Pour les patients symptomatiques, le statut de mutation *MYD88* et *CXCR4* peut être utilisé pour le choix du traitement. Afin de minimiser les risques d'effets secondaires indésirables liés au traitement à court et à long terme, tels que la neuropathie, l'immunosuppression et les lésions des cellules souches, ainsi que la myélodysplasie secondaire et les tumeurs malignes.

- Chez les **patients ne présentant pas la mutation *CXCR4***, l'utilisation d'ibrutinib (ciblant Btk) peut être envisagée comme un traitement de premier choix [269].
Son efficacité dépasse les 90% [270]. Toutefois, chez ces patients ne présentant ni la mutation *CXCR4*, ni de signe d'hyperviscosité symptomatique et n'ayant pas un besoin urgent de contrôler la maladie, l'Ibrutinib en association avec le Rituximab (anti-CD20) peut être préféré à l'Ibrutinib seul. En effet, l'association Ibrutinib/Rituximab induit une réponse plus courte, 3 mois contre 6-7 mois pour l'Ibrutinib seul [269].
- Pour les **patients présentant à la fois des mutations *MYD88* et *CXCR4***, une réponse retardée à l'Ibrutinib a été constatée [267]. Les patients présentant une mutation *CXCR4* non-sens ont un risque élevé de présenter une hyperviscosité symptomatique nécessitant un contrôle immédiat de la maladie [158]. La nécessité d'obtenir une réponse rapide doit donc être prise en compte. Par conséquent, des altérations à l'Ibrutinib doivent être envisagées. Pour se faire il est possible d'utiliser les associations suivantes soit :
 - la Bendamustine et le Rituximab (Benda-R)
 - un traitement à base d'inhibiteurs du protéasome comme le Bortézomib, combiné avec la Dexaméthasone et le Rituximab (BDR)
 - Carfilzomib, Rituximab et Dexaméthasone (CaRD);
 - Ixazomib, Dexaméthasone et Rituximab (IDR).
 - Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone plus Rituximab (R-CHOP)

Le BDR est à privilégier chez les sujets atteints d'amylose LC symptomatique afin de minimiser la neuropathie liée au traitement. Ce traitement est actuellement considéré comme le traitement de premier choix [271]. C'est un traitement bien toléré, avec un taux de réponse de 83%.

- Pour les **patients atteints d'une MW de type MYD88 sauvage**, un traitement à base de Bendamustine ou de Bortezomib (inhibiteur du protéasome)/Rituximab doit être envisagé [272].

Chez les patients en rechute ou réfractaires au traitement, il est possible de proposer les traitements thérapeutiques utilisés en première ligne ou une thérapie combinée tel que le R-CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone, Rituximab). Toutefois, il est préconisé de privilégier les alternatives aux alkylants ou aux analogues nucléosidiques surtout si elles ont déjà été utilisées pour minimiser les dommages aux cellules souches. Pour les patients qui ont connu de multiples rechutes et qui ont déjà été exposés à des agents alkylants, des inhibiteurs de protéasome et à l'Ibrutinib, l'utilisation hors AMM du Vénétoclax peut être envisagée [273]. L'Everolimus, seul ou en association avec le Bortezomib et le Rituximab, peuvent également être envisagés chez les patients précédemment exposés à des agents alkylants, des inhibiteurs de protéasome et à l'Ibrutinib, bien que des toxicités hématologiques et une pneumonie auto-immune soient notables [274] [275]. Chez les jeunes patients ou réfractaires aux traitements l'autogreffe peut être envisagée. Cependant, cela n'est possible que si un prélèvement de moelle a été effectué avant une exposition prolongée aux analogues de purines et aux agents alkylants [276] [277].

Pour les patients qui développent une intolérance à l'Ibrutinib, l'utilisation hors AMM de l'Acalabrutinib peut être envisagée [267]. Pour ceux développant une intolérance au Rituximab, l'Ofatumumab est présentée comme étant une bonne alternative [278] [279].

En résumé, les principales options thérapeutiques comprennent les agents alkylants, les analogues nucléosidiques et le Rituximab, en monothérapie ou en association. Les résultats préliminaires des études testant de nouvelles combinaisons de chimiothérapies sont encourageants, mais aucune association thérapeutique n'a fait la preuve de sa supériorité. Aucun d'entre eux ne permet une rémission complète, seule une augmentation de la survie ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie sont possibles.

La plupart des traitements de la MW étant agressifs et non spécifiques de la maladie, ils s'accompagnent d'effets secondaires : nausées ou vomissements, constipation, diarrhées, faible numération globulaire, perte de cheveux, fatigue, réactions aux perfusions, risque d'infections accru et

neuropathie. Il faut donc développer de nouveaux agents thérapeutiques pour la MW. Une meilleure connaissance de la physiopathogénie de cette maladie permettrait d'envisager des thérapeutiques ciblées. Pour les patients jeunes, le but est de pouvoir contrôler le plus possible la maladie et établir ainsi une stratégie thérapeutique adaptée aux facteurs pronostiques. Pour les sujets âgés, le but est de préserver une bonne qualité de vie, avec des traitements efficaces, mais peu toxiques.

Chapitre 6 : Étude de l'impact de l'expression de la mutation L265P au travers de modèle murin

Dans le cadre de l'étude de maladies humaines, le modèle animal a pour but de valider ou invalider des hypothèses en termes de physiopathologie au niveau des organes, des tissus, des cellules et/ou des molécules impliquées. En effet, les modèles basés sur des cultures cellulaires ou des tissus ou organes seuls ne sont souvent pas suffisants à la compréhension des maladies.

Cependant, la pertinence de l'utilisation de l'animal comme modèle, lors d'études d'affections humaines, dépend de sa capacité à représenter avec précision la maladie étudiée. La souris s'est imposée comme un choix pertinent pour de nombreuses raisons.

- La souris est le meilleur modèle pour l'étude du système : immunitaire, musculaire, endocrinien, nerveux, cardio-vasculaire et squelettique.
- Elle possède tous les atouts pour l'élevage en laboratoire : une descendance nombreuse, un développement rapide et une taille réduite, un cycle de reproduction très court (3 semaines). Ces caractéristiques ont l'avantage de permettre un développement rapide des lignées et des analyses statistiques pertinentes.
- Le caractère reproductible des expériences est possible par le maintien de conditions d'hébergement identiques et hautement standardisées d'un individu à l'autre (climat, statut sanitaire, pression infectieuse...).
- De plus, sur le plan génétique, la souris est très similaire à l'homme au point de vue physiologiques et pathologiques. Le génome de la souris est environ 14% plus petit que le génome humain, mais les deux génomes contiennent chacun environ 24000 à 25000 gènes. En effet, plus de 75% des gènes orthologues sont communs aux deux espèces et sur l'ensemble du génome humain et murin moins de 1% des gènes semblent n'avoir aucune homologie [280].

Dans notre cas, si on regarde en détail la séquence en acide aminé de la protéine MYD88 on constate que seul 8 acides aminés sur 136 diffèrent entre la séquence humaine et murine. Ce qui correspond à plus de 95 % d'homologie entre les deux séquences.

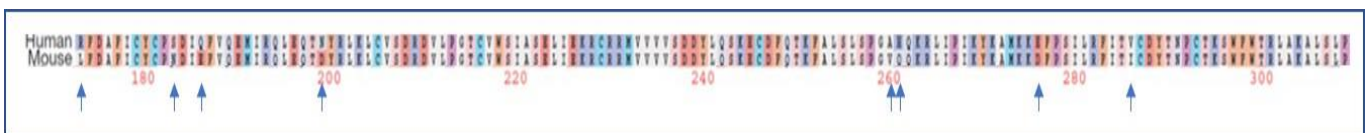


Figure 29 : Séquence MYD88 humaine et murine. Ces séquences présentent plus de 95% d'homologie avec seulement 8 acides aminés de différences.

Dans le génome murin la mutation humaine L265P est retrouvée en position 252. Par conséquent, *MYD88* L252P est l'orthologue murin de la mutation *MYD88* L265P chez l'humain.

Revue des modèles publiés

Dans ce paragraphe, je vais passer en revue les modèles d'expression de la mutation humaine *MYD88* L265P ou de son équivalent murin L252P développés avant et au cours de ma thèse.

Précédemment, nous avons vu que *MYD88* est une protéine adaptatrice en aval de la plupart des récepteurs Toll-like (TLR) et interleukine-1 (IL-1) (cf. chapitre 2) C'est pour cette raison que Wang *et al.* [281] ont traité ces tumeurs malignes avec des inhibiteurs de récepteurs endosomiques de type Toll (TLR9, TLR7). Dans cet article, les auteurs utilisent des cellules B matures activées provenant de souris sauvages, mutantes *Unc93b1^{3d/3d}* pour lesquelles la signalisation TLR9 et TLR7 est bloquée, ou déficientes en *Tlr9* transduites avec un rétrovirus codant *MYD88* L265P. Les analyses *in vitro* et *in vivo* sur des souris receveuses *Rag1^{-/-}* transplantées (pour lequel la différenciation lymphoïde est bloquée au stade précoce du développement), montrent que la mutation *Unc93b1^{3d/3d}* ou la déficience en *Tlr9* inhibent la croissance des cellules B *MYD88* L265P *in vitro*, alors qu'elles ont augmenté *in vivo* l'accumulation de ces cellules sous forme de plasmablastes CD19^{low}

Ces résultats révèlent un effet inhibiteur puissant et inattendu du TLR9 sur la prolifération et la différenciation des lymphocytes B *MYD88* L265P qui semble indépendant du TLR7, et ils fournissent un indicateur préclinique pour la prudence dans les essais cliniques, des inhibiteurs TLR7/9 pour le traitement de la maladie.

Le premier modèle murin d'expression de *Myd88* L252P a été publié en 2016 par Knittel *et al.* [282]. Ils ont conceptuellement généré un modèle de souris dans lequel le transgène *Myd88* L252P est exprimé spécifiquement dans les cellules B grâce au système Cre/lox. Dans ce modèle la mutation *MYD88* L252P est intégré au niveau du locus endogène de *Myd88*.

Ce travail montre que ces souris développent une maladie lymphoproliférative qui se transforme occasionnellement (~30%) en lymphomes polyclonaux. Ils démontrent que, quel que soit le stade de différenciation B dans lequel la mutation L252P est exprimée, (stade pro-B, centre germinatif, stade transitionnel) cela conduit à un désordre lymphoprolifératif.

L'ensemble de leurs données semblent indiquer que l'expression de *Myd88* L252P conduit à un blocage de la différenciation des cellules B après le centre germinatif avec des cellules B exprimant *Irf-4* et non *Bcl6*. Ces observations sont conformes aux données de patients atteints de lymphome humain, telles que les DLBCL de type ABC, la MW et les LLC, ce qui suggère que les mutations oncogènes *Myd88* sont enrichies dans les tumeurs malignes post-centre germinatif (GC) avec mutation IGHV et GC.

Dans cette même étude, ils montrent que la co-expression de *Myd88* L252P et *BCL2* conduit dans 100% des cas au développement de DLBCL de type ABC. Le croisement de souris *Myd88* L252P et

Ep-BCL2 s'est avéré essentiel pour accélérer la lymphomagenèse. Afin de valider leur approche les auteurs ont croisés leurs analyses avec celles de données de séquençage du génome DLBCL humain. Ainsi ils ont confirmé que les amplifications de BCL2 coïncidaient fréquemment avec les mutations *MYD88* chez les patients DLBCL de type ABC.

Knittel *et al.* ont développé un modèle *Myd88* L252P qui génère principalement des DLBCL de type ABC. Cependant, cette mutation est rencontrée dans seulement 29% des cas de DLBCL de type ABC contre 90% des cas de MW. Selon eux, la mutation *MYD88* n'est pas suffisante pour induire un LPL de type MW suggérant que d'autres mutations secondaires sont nécessaires pour induire un MW.

En 2019 Sewastianick *et al.* [283] ont proposé un modèle différent de celui de Knittel. Ce modèle de souris exprime la mutation humaine L265P et non la mutation murine L252P. De plus, le locus endogène n'est pas modifié puisque le transgène est inséré dans le locus *Col1A1* qui permet d'avoir une expression forte du transgène inséré.

Grâce à ce modèle, ils démontrent que la mutation *MYD88* L265P favorise le développement d'un trouble lymphoprolifératif non clonal de bas grade à cellules B présentant plusieurs caractéristiques clinico-pathologiques qui ressemblent à la LPL/WM humaine, notamment une expansion des cellules lymphoplasmacytoïdes, l'augmentation de la concentration sérique d'immunoglobuline M (IgM), la formation de rouleaux et le nombre accru de mastocytes dans la moelle osseuse, et une signalisation pro-inflammatoire qui progresse sporadiquement jusqu'à un DLBCL clonal de haut grade. Ils arrivent à la même conclusion que Knittel à savoir que bien que la *MYD88* L265P puisse être indispensable au phénotype LPL/WM, elle ne suffit pas à elle seule à entraîner une transformation maligne dans les lymphocytes B. Cette transformation dépendrait d'autres événements génétiques coopérants avec *MYD88*.

En 2020 Schmidt *et al.* ont publié un nouveau modèle d'expression de la mutation murine *Myd88* L252P en utilisant la même stratégie que Knittel[284]. Contrairement à ce dernier, ils démontrent que, lorsque l'expression B spécifique de la mutation *Myd88* L252P est suffisante pour induire une gammopathie pré-maligne ressemblant au MGUS de type IgM. En effet, son expression induite dès les stades précoces (stade pro-B) n'altère pas le développement B mais ils observent avec l'âge une accumulation anormale de plasmocytes exprimant les IgM au sein de la rate et les os, caractéristique d'une maladie lymphoproliférative polyclonale de bas grade. Afin de tester si la mutation *Myd88* L252P pouvait provoquer des expansions clonales, ils ont introduit dans une petite fraction de cellules B CD19 positives la mutation *Myd88* L252P. Ainsi, ils montrent que la mutation *Myd88* L252P est suffisante pour favoriser la survie et l'expansion des plasmocytes exprimant l'IgM pouvant s'apparenter au syndrome MGUS à IgM. Ce modèle est celui qui se rapproche le plus de la situation chez les patients

humains, où la mutation *MYD88* se produit vraisemblablement comme un événement rare dans une cellule B progénitrice tumorale. Cependant, même si ce modèle semble très proche de la pathologie humaine, l'activation continue d'une mutation endogène *Myd88* L252P par CD19-Cre n'a pas provoqué de maladie lymphoproliférative fulminante ou une transformation accrue en lymphome B ou une mortalité accrue. Schmidt *et al*, émettent l'hypothèse que ces divergences peuvent être causées par différents signaux externes (tels que la signalisation TLR induite par statut sanitaire non EOPS) ou dues à l'effet moléculaire d'une forte surexpression transgénique, ou les deux et non à une différence entre les protéines humaine L265P et murine L252P comme suggéré par Sewastianik *et al*.

OBJECTIFS

Malgré les traitements actuels mis en place, la maladie de Waldenström reste incurable et de nouvelles stratégies sont nécessaires. Après la découverte de la mutation *MYD88* dans la majorité des cas de MW en 2013, un des objectifs est de développer un modèle animal mimant la pathologie humaine afin de mieux comprendre son émergence et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Malgré les différents modèles publiés au cours de ma thèse, la MW manque toujours d'un modèle de souris génétiquement modifié pour son étude. En effet, le rôle exact de la mutation *MYD88* dans l'initiation du lymphome et sa capacité à favoriser la transformation néoplasique, n'ont toujours pas entièrement compris. Il en résulte que des améliorations supplémentaires sont nécessaires pour obtenir de meilleures corrélations avec les caractéristiques de la maladie de la MW. La stratégie adoptée par le laboratoire en 2015, a été de créer un modèle transgénique de souris avec insertion de la mutation murine *Myd88 L252P* dans le locus *Rosa26*. La mutation *MYD88* étant retrouvée principalement dans les LNHB de type MW (90%) et ABC-DLBCL (30%), nous avons voulu exprimer la mutation uniquement dans le compartiment B grâce au système Cre/Lox. Ainsi, après croisement avec des souris CD19_Cre qui exprime la recombinaise Cre dès les premiers stades du développement B, nous pouvons poser la question du rôle de *MYD88* dans la transformation lymphocytaire B.

Le premier objectif de ma thèse a alors été de caractériser ce nouveau modèle transgénique. Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, la mutation *MYD88* induit un changement de conformation de la protéine aboutissant à son activation constitutive ainsi que les voies de signalisation en aval. Parmi ces voies, on retrouve notamment une suractivation continue du facteur de transcription NF- κ B qui conduit, de part ses gènes cibles, à la transformation cellulaire et l'émergence tumorale. Parmi les gènes dérégulés par la voie NF- κ B, on retrouve des gènes impliqués dans l'échappement à la réponse immune (par exemple, *IL10*, *CD80*, *MYC*, *CD86*, *CD274*, *IL6*, *PIM1*).

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'initier le rôle de *MYD88* dans le contrôle de la réponse immune contre la tumeur. Pour cela, j'ai mis au point un modèle *in vitro* à partir d'une lignée cellulaire humaine (ERE2.5) dans laquelle, je fais exprimer la mutation humaine *MYD88 L265P*. En parallèle de l'étude des conséquences de son expression en terme de signalisation, d'inflammation et de transformation, j'ai évalué le potentiel de ces cellules à acquérir des caractéristiques de cellules B régulatrices

RESULTATS

7.1. Étude du rôle de la mutation murine *Myd88* L252P au travers de la création d'un modèle *in vivo* original.

Les PAMPs tel que le LPS, les ODN CpG induisent via l'activation des TLRs et de leur protéine adaptatrice MYD88, la prolifération des cellules B normales [285] et tumorales [286]. L'activation de la voie NF- κ B est considérée comme la clé de voute de la prolifération cellulaire induite par la stimulation TLR. Lorsque l'un des acteurs intervenant dans cette voie de signalisation est muté, comme dans le cas de la maladie de Waldenström (MW), où dans 90% des cas *MYD88* est muté, on observe une activation continue de la voie canonique NF- κ B. La MW est un lymphome B indolent incurable. La découverte de la mutation L265P de MYD88 activatrice de NF- κ B dans plus de 90% des cas a démontré que la MW est génétiquement distincte des autres lymphomes indolents avec sécrétion d'IgM. *MYD88* apparaît donc comme étant le premier événement oncogénique de la maladie.

Cependant s'il est admis que *MYD88* L265P est à l'origine de la MW, les modèles murins déjà existants (*cf.* Chapitre 7) ne permettent pas de démontrer le rôle exact de *MYD88* mutée dans l'émergence d'un clone lymphoplasmocytaire B de type MW. Pour cela en 2015, nous avons souhaité développer un modèle de souris « Knock-In » avec expression de la mutation murine *Myd88* L252P dans les cellules B. Pour développer ce modèle, la stratégie choisie a été d'insérer par recombinaison homologue un transgène porteur de la mutation *Myd88* L252P dans le locus *Rosa26*.

Le locus *Gt(Rosa)26*, est situé sur le chromosome 6. Ce locus contient le gène d'un long ARN non-codant sous le contrôle d'un promoteur constitutif et d'expression ubiquitaire. L'activité transcriptionnelle omniprésente du locus suggère que la région génomique n'est pas affectée par le phénomène de condensation/décondensation de chromatine qui pourraient conduire à la répression transcriptionnelle des transgènes insérés. Par conséquent, elle est devenue un site d'insertion fiable pour les transgènes exogènes. Ces transgènes peuvent être introduits dans le premier intron où la présence d'un accepteur d'épissage puissant permet à l'expression du transgène d'être pilotée par le promoteur ubiquitaire endogène. De plus, l'expression du transgène peut être contrôlée, à la fois spatialement et temporellement, grâce au système Cre/Lox [287] [288]. Des vecteurs de ciblage standardisés pour *Rosa26* sont maintenant facilement disponibles, dont certains ont été adaptés pour des méthodologies de clonage facilité telles que le système Gateway [289] [290].

Le transgène utilisé contient, en plus du cDNA *Myd88* muté (*Myd88* L252P), le cDNA du gène codant pour une protéine de fluorescence : la *Yfp* (Yellow Fluorescence Protein) avec une séquence IRES entre les deux qui permet de produire les protéines de manière indépendante et non en fusion (cf. **Figure 30**).

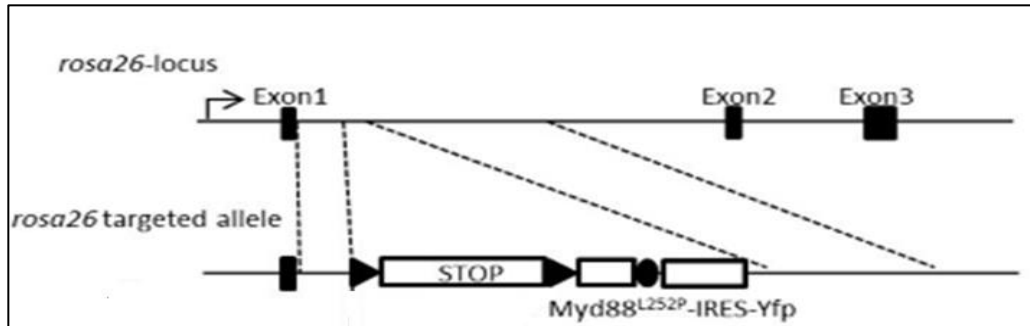


Figure 30 : Recombinaison homologue du transgène MYD88 L252P- *Yfp* au niveau du locus *Rosa26*.

MYD88 L252P est orthologue de la séquence humaine *MYD88* L265P. Le transgène est inséré dans le locus *Rosa26* et est composé du gène de résistance à la néomycine et d'une séquence STOP flanqués de sites LoxP (triangles noirs) en amont du cDNA de *Myd88* muté (L252P) et du cDNA de la *Yfp* séparés par une séquence IRES.

Grâce à la *Yfp*, il nous a été possible de suivre les cellules qui expriment le transgène en fonction de leur localisation. Le transgène est exprimé spécifiquement dans les cellules B grâce au système Cre/lox. Ici le gène de la recombinase Cre a été intégré dans le locus *Cd19* afin que de la CRE recombinase soit uniquement exprimée dans les lymphocytes B. Le croisement de ces souris CD19-Cre avec les souris *Myd88* L252P aboutit à l'élimination de la cassette stop permettant ainsi l'expression du transgène *Myd88* L252P-YFP uniquement dans les lymphocytes B (cf. **Figure 31**).

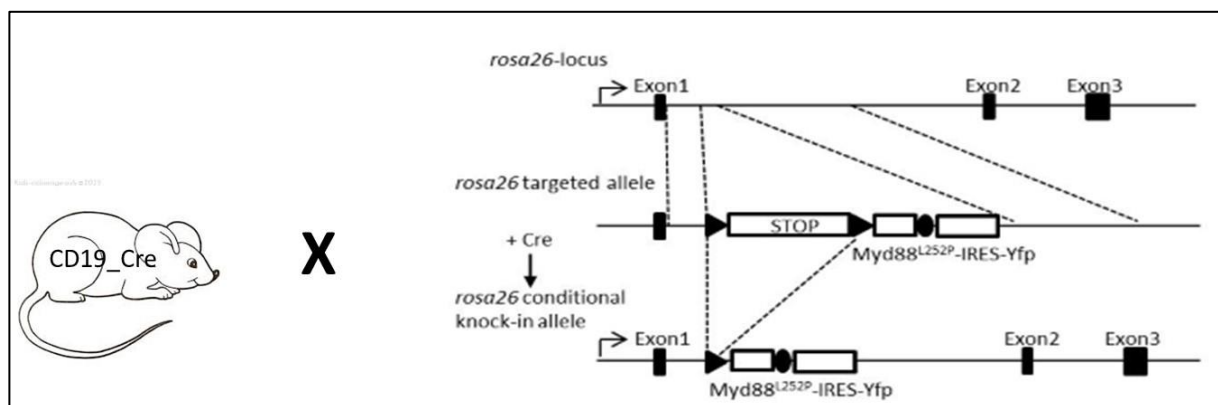


Figure 31 : Modèle murin *Myd88* L252P.

Le croisement de ces souris CD19-Cre avec les souris *Myd88* L252P permettra d'éliminer la cassette STOP et l'expression du transgène uniquement dans les cellules B

Les souris *Myd88* L252P ont montré une différenciation accrue des plasmocytes IgM caractérisée tout d'abord par une hyper gammaglobulinémie polyclonale sérique (hyper Ig) chez les souris les plus jeunes qui s'est transformée en pic d'immunoglobulines (Ig) chez les souris plus âgées. La présence de ces pics d'Ig monoclonaux est directement corrélée à une hypertrophie de la rate. Au niveau de la moelle, l'augmentation du nombre des cellules B IgM⁺ et de plasmocytes IgM est associé à un continuum de différenciation plasmocytaire chez les souris jeunes marqué par une expression continue du CD138 et à la perte du marqueur B220.

À partir des profils d'expression de gènes des souris MYD88 L252P, nous avons montré que les cellules B tumorales MYD88 L252P issus de la rate possédaient une signature transcriptomique similaire à celle de patients atteints de la MW.

L'ensemble, de ces résultats démontrent pour la première fois que l'activation continue de MYD88 est spécifiquement associée à la transformation clonale des cellules B IgM en différenciation. Malgré le fait que notre modèle ne mime pas toutes les caractéristiques de la MW, ce modèle est actuellement le seul qui se rapproche aussi précisément de la MW.



Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells

OPEN ACCESS

Edited by:

Pablo Engel,
University of Barcelona, Spain

Reviewed by:

Hiromi Kubagawa,
German Rheumatism Research
Center (DRFZ), Germany
Rachel Maurie Gerstein,
University of Massachusetts Medical
School, United States

*Correspondence:

Christelle Vincent-Fabert
christelle.vincent-fabert@unilim.fr
Jean Feuillard
jean.feuilleard@unilim.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

[‡]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
B Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 December 2020

Accepted: 14 April 2021

Published: 04 May 2021

Citation:

Ouk C, Roland L, Gachard N,
Poulain S, Oblet C, Rizzo D,
Saintamand A, Lemasson Q,
Carrion C, Thomas M, Balabanian K,
Espéli M, Parrens M, Soubeyran I,
Boulin M, Faumont N, Feuillard J and
Vincent-Fabert C (2021) Continuous
MYD88 Activation Is Associated With
Expansion and Then Transformation of
IgM Differentiating Plasma Cells.
Front. Immunol. 12:641692.
doi: 10.3389/fimmu.2021.641692

Catherine Ouk^{1†}, Lilian Roland^{1†}, Nathalie Gachard^{1‡}, Stéphanie Poulain^{2‡}, Christelle Oblet¹, David Rizzo¹, Alexis Saintamand¹, Quentin Lemasson¹, Claire Carrion¹, Morgane Thomas¹, Karl Balabanian³, Marion Espéli³, Marie Parrens⁴, Isabelle Soubeyran⁵, Mélanie Boulin¹, Nathalie Faumont¹, Jean Feuillard^{1*} and Christelle Vincent-Fabert^{1*}

¹ UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL, University of Limoges, and Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, Limoges, France, ² UMR CANTHER « CANCER Heterogeneity, Plasticity and Resistance to THERapies » INSERM 1277-CNRS 9020 UMRS 12, University of Lille, Hematology Laboratory, Biology and Pathology Center, CHU de Lille, Lille, France, ³ Institut de Recherche Saint-Louis, EMILy, INSERM U1160, University of Paris, Paris, France, ⁴ Pathology Department, Hospital University Center of Bordeaux, Bordeaux, France, ⁵ Laboratory of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

Activating mutations of *MYD88* (*MYD88*^{L265P} being the far most frequent) are found in most cases of Waldenström macroglobulinemia (WM) as well as in various aggressive B-cell lymphoma entities with features of plasma cell (PC) differentiation, such as activated B-cell type diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). To understand how MYD88 activation exerts its transformation potential, we developed a new mouse model in which the *MYD88*^{L252P} protein, the murine ortholog of human *MYD88*^{L265P}, is continuously expressed in CD19 positive B-cells together with the Yellow Fluorescent Protein (*Myd88*^{L252P} mice). In bone marrow, IgM B and plasma cells were expanded with a CD138 expression continuum from IgM^{high} CD138^{low} to IgM^{low} CD138^{high} cells and the progressive loss of the B220 marker. Serum protein electrophoresis (SPE) longitudinal analysis of 40 *Myd88*^{L252P} mice (16 to 56 weeks old) demonstrated that ageing was first associated with serum polyclonal hyper gammaglobulinemia (hyper Ig) and followed by a monoclonal immunoglobulin (Ig) peak related to a progressive increase in IgM serum levels. All *Myd88*^{L252P} mice exhibited spleen enlargement which was directly correlated with the SPE profile and was maximal for monoclonal Ig peaks. *Myd88*^{L252P} mice exhibited very early increased IgM PC differentiation. Most likely due to an early increase in the Ki67 proliferation index, IgM lymphoplasmacytic (LP) and plasma cells continuously expanded with age being first associated with hyper Ig and then with monoclonal Ig peak. This peak was consistently associated with a spleen LP-like B-cell lymphoma. Clonal expression of both membrane and secreted μ chain isoforms was demonstrated at the mRNA level by high throughput sequencing. The *Myd88*^{L252P} tumor transcriptomic signature identified both proliferation and canonical NF- κ B p65/RelA activation. Comparison with *MYD88*^{L265P} WM showed that *Myd88*^{L252P} tumors also

shared the typical lymphoplasmacytic transcriptomic signature of WM bone marrow purified tumor B-cells. Altogether these results demonstrate for the first time that continuous MYD88 activation is specifically associated with clonal transformation of differentiating IgM B-cells. Since MYD88^{L252P} targets the IgM PC differentiation continuum, it provides an interesting preclinical model for development of new therapeutic approaches to both WM and aggressive MYD88 associated DLBCLs.

Keywords: MYD88 L265P mutation, lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström's macroglobulinemia, IgM secretion, monoclonal Ig peak, B-cell lymphoma, plasma cell

INTRODUCTION

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is an incurable indolent B-cell lymphoma of the elderly accounting for less than 5% of B-cell lymphomas with, as unique characteristics, a serum IgM peak and primary medullary localization of lymphoplasmacytic cells that exhibit continuous differentiation from mature B lymphocytes to IgM secretory plasma cells (1). Secondary lymphoid organ infiltration and/or a leukemic phase is found in 20% cases. Other manifestations include neuropathy, cryoglobulinemia, skin rash, cold-agglutinin hemolytic anemia, and amyloidosis (2). The discovery of the activating mutation of MYD88 (MYD88^{L265P} being the far most frequent) in more than 90% of WM cases contributed to the concept that this entity is genetically distinct from other B-cell lymphomas (3, 4). Being present in 50% of IgM monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS), MYD88 mutations are most likely a primary event in WM (5). Considered as secondary genetic events, activating mutations of CXCR4 (CXCR4^{S338X} or CXCR4^{WHIM}), a receptor implicated in migration and bone marrow (BM) homing of leucocytes, are found in 30% of WM cases (6). Additional mutations of CD79b, ARID1A or TP53 have been reported (7).

Despite these advances, WM pathophysiology is incompletely understood. Its treatment remains challenging and the exact role of MYD88 mutations in the emergence of lymphoplasmacytic B-cell clones is not known (7, 8). Indeed, MYD88 mutations are also found in 30% of activated B-cell type diffuse large B-cell lymphomas (ABC-DLBCL), more than half of primary cutaneous DLBCLs, leg type, and many DLBCLs at immune-privileged sites but not in plasma cell myelomas, even IgM types (9). It should be noted that IgM expression is a surrogate marker of ABC-DLBCLs (10). Moreover, all these aggressive B-cell tumors associated with MYD88, which often exhibit morphological features of plasma cell (PC) differentiation, are all associated with expression of the PC differentiation marker IRF4. MYD88 protein is the canonical adapter for inflammatory signaling pathways to downstream members of the Toll-like receptor (TLR) and interleukin-1 receptor (IL-1R) families. Forming the myddosome complex, MYD88 binds IL-1R or TLR family members to IRAK kinases family. IRAK activation leads to activation of the NF kappa B (NF-κB) transcription factor and interferon 3 and 7 regulatory factors (IRF3 and 7). MYD88^{L265P} constitutively increases formation of the myddosome complex with downstream NF-κB activation (3, 11, 12).

Experimentally, MYD88^{L265P} is essential for survival of ABC-DLBCL and WM cell lines (3, 11). A recent publication suggests the involvement of HOIP and LUBAC-dependent NF-κB activation in the transformation potential of MYD88 activation in a mouse model (13). The current published mouse models with continuous MYD88 activation in the B-cell lineage develop aggressive clonal B-cell lymphomas that resemble human ABC-DLBCLs (13–15). Although discussed by Jo et al. in the HOIP/LUBAC activation context, no IgM peak was reported in these models. Therefore, the question of a direct role for MYD88 in the development of a lymphoplasmacytic lymphoma with monoclonal IgM secretion is still open. Recently, K Schmidt et al. reported a mouse model in which MYD88 activation was responsible for an indolent lymphoproliferative disorder resembling to IgM monoclonal gammopathy of unknown significance (IgM MGUS), the asymptomatic preclinical stage of WM (16).

Here, we present a new mouse model in which the MYD88^{L252P} protein, the murine ortholog of human MYD88^{L265P}, is continuously expressed in the B-cell lineage together with Yellow Fluorescent Protein (YFP) (Myd88^{L252P} mice). We show that these mice first developed early expansion of CD93^{neg} IgM PCs with an increase in both IgM secretion and bone marrow relocalization of IgM B-cells. Moreover, these mice also had increased percentages of IgM^{high} CD138^{low} and IgM^{low} CD138^{high} cells with a CD138 expression continuum between both cell types. Then, these mice developed an oligoclonal or clonal IgM lymphoplasmacytic-like B-cell lymphoma together with a serum IgM monoclonal peak. These tumors had marked transcriptomic similarities to WM but they were located in the spleen and exhibited significant increased proliferation. Despite differences between Myd88^{L252P} LP-like B-cell tumors and WM, our results demonstrate that the MYD88 transformation potential is strongly associated with a shift in B-cell peripheral differentiation toward plasma cells with IgM secretion. These results help explain why MYD88 activation is found in most WM and in various aggressive B-cell lymphomas with IgM PC differentiation engagement such as ABC DLBCLs.

MATERIALS AND METHODS

Generation of the Transgenic Mouse Line Myd88^{L252P}

The transgenes (cDNA) Myd88^{WT}-IRES-Yfp and Myd88^{L252P}-IRES-Yfp were synthesized (Genecust, Dudelange, Luxembourg)

and inserted into the pcDNA3.1 vector. Sequences of these transgenes are given in **Supplementary Materials and Methods**. The *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26-1 vector (17) containing a LoxP-flanked region, consisting of a stop cassette and the *Neomycin* gene (18). The transgene *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* was inserted downstream from the stop cassette. JM8 embryonic stem (ES) cells were transfected with the targeting vector according to a previously described protocol (19). Targeted ES cells were screened for homologous recombination by PCR. Genomic DNA (gDNA) extraction was performed using an in house protocol and consisted of gDNA precipitation with absolute ethanol. Twenty nanograms gDNA were used for each PCR (primer sequences in **Supplementary Materials and Methods**) using LongAmp[®] Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's recommendations. Recombined ES cells were injected into C57BL/6J blastocysts which were transferred into foster mothers to obtain chimeric mice (Myd88^{L252P-flSTOP} mice).

Mice

Cd19^{Cre} mice (20) and mice carrying the *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* allele were crossed to induce the expression of the transgene in B cells (Myd88^{L252P} mice). Offspring were routinely screened by PCR using specific primers for insertion of the transgene (**Supplementary Materials and Methods**). Animals were housed at 21–23°C with a 12-hour light/dark cycle. All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number: 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-2018041009469362 v3).

Cell Transfection and NF-κB Dependent Dual-Luciferase Reporter Assay

A20 cells (5.10⁶) were co-transfected with 5 μg of either empty pcDNA3.1, pcDNA3.1-*Myd88^{WT}* or pcDNA3.1-*Myd88^{L252P}* vectors, plus 100 ng pRL-TK *Renilla luciferase* expression vector (Promega Corporation, Madison, WI) and 5 μg of either the 3X-κB-L vector with three copies of the major histocompatibility complex (MHC) class I κB element or its mutated counterpart, the 3X-mutκB-L vector (21) using Amaxa L013 program (AMAXA Biosystems, Cologne, Germany). Twenty four hours after transfection, cells were lysed and luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System and the Turner Designs TD-20/20 Luminometer (Promega Corporation, Madison, WI).

Sera Analyses

Serum was obtained from blood collected retro-orbitally. Specific ELISA and serum electrophoresis assay were performed as previously described (19, 22).

Flow Cytometry and *In Vivo* Proliferation Assays

In order to collect BM cells of Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} mice, femurs from both hind legs were rinsed with PBS and sternum

was gently crushed and cells filtered on a nylon meshwork that was rinsed with PBS. Spleen cells from Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} were filtered through a sterile nylon membrane. Blood samples were collected retro-orbitally. Red cells were lysed by RBC Lysis Buffer (Biolegend, San Diego, CA). Cell suspensions were resuspended at 4°C in a labeling buffer (PBS, 1% BSA, 2mM EDTA) and labeled with fluorescent conjugated monoclonal antibodies listed in **Supplementary Materials and Methods**. Labeled cells were analyzed using a BD Fortessa SORP flow cytometer (BD Bioscience France, Le Pont de Claix, France). Results were analyzed using Kaluza Flow Cytometry software 1.2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

Immunohistochemistry

Paraffin embedded tissue sections (5μm) were deparaffinized as follows: slides were immersed successively in xylene twice for 3 min, 3 times for 3 min in 100% ethanol, once for 3 min in 95% ethanol and 3 times in PBS for 5 min. Then, slides were immersed in citrate buffer pH7 and heated 4 times for 5 min 40 sec in a microwave at 800W. Image acquisition was performed with the Nanozoomer 2.0RS Hamamatsu and NDP.scan software (812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamamatsu City, 431-3196, Japan). Quantification of Ki67 nuclear labelling was performed with the imageJS and the Ki67 module: <http://imagejs.org/?http://module.imagejs.googlecode.com/git/mathbiol.chromomarkers.js&http://module.imagejs.googlecode.com/git/ki67> (23).

Gene Expression Profiling

A series of seven mice (three Cd19^{Cre} and four Myd88^{L252P}) was studied in parallel with bone marrow purified tumor B-cells from a series of 11 patients with *MYD88^{L265P}* WM (series 1) as well as lymph nodes from a series of 58 patients: 19 *MYD88^{WT}* chronic lymphocytic leukemia, 15 *MYD88^{L265P}* WM, 12 *MYD88^{wt}* Nodal marginal zone lymphoma, 5 *MYD88^{wt}* WM, 4 follicular lymphoma and 3 patients with benign follicular hyperplasia (series 2, **Supplementary Tables 1 and 2**). Approval of this protocol was obtained from the local IRB of the CHRU of Lille (CSTMT043). *MYD88* and *CXCR4* mutational status was determined as previously described (6). Total mRNA was extracted from whole infiltrated tissues and purified B-cells as reported (24). For humans and mice, RNA amplification and hybridization onto microarrays were performed on an Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array and on an Affymetrix Gene Atlas system[®] with the MoGene-2_1-st-v1 Affymetrix chip (Affymetrix, Santa Clara, CA) respectively according to a previously described protocol (25) (GEO accession number GSE138273). Bioinformatic analyses are detailed in **Supplementary Materials and Methods**.

Repertoire Analysis

RNA was extracted from total spleen, and 1μg was used for sequencing. Transcripts were amplified by 5'RACE PCR using reverse primers hybridizing within either the membrane or secreted exon of the μ or γ genes. ProtoScript[®] II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used for reverse transcription and amplicons were obtained using

Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's instructions. Primers used are listed in **Supplementary Materials and Methods**. Illumina sequencing adapter sequences were added by primer extension, and resulting amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq sequencing system using MiSeq kit Reagent V2 500 cycles. Paired reads were merged using FLASH (26). Repertoire analysis was done using the IMGT/HighV-QUEST online tool (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest). The resulting output was parsed by in-house R script.

RESULTS

Generation of a Mouse Model With Insertion of the Mouse Mutation Myd88^{L252P} Into the Rosa26 Locus

To study the effect of continuous MYD88 activation on B-cell differentiation, we created a transgene containing the mutant murine cDNA sequence of *Myd88* (*Myd88^{L252P}*) which is orthologous to the human mutant sequence *MYD88^{L265P}*, in frame with the Yellow Fluorescent Protein (*Yfp*) sequence and separated by an Internal Ribosome Entry Site (IRES) sequence (*Myd88^{L252P}-IRES-Yfp*) (**Supplementary Figure 1A**). To validate this transgene, we checked that it induced expression of both MYD88^{L252P} and YFP proteins in the murine A20 B-cell line (**Supplementary Figures 1B, C**) and that it was responsible for constitutive NF-κB activation (**Supplementary Figure 1D**). The *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26.1 vector (17) (**Supplementary Figure 1E**). In this construct, the insert was subcloned downstream from a *Neomycin-STOP* cassette flanked by LoxP sites. Chimeric mice were intercrossed to obtain stable germinal transmission of the *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* transgene (*Myd88^{L252P}-flSTOP* mice). *Myd88^{L252P}-flSTOP* and *Cd19^{Cre}* mice were crossed. Mice with both transgenes (*Myd88^{L252P}* mice) were then studied, with their age matched *Cd19^{Cre}* littermates as controls (*Cd19^{Cre}* LMC). Specific B-cell expression of the transgene was found in more than 90% of blood and spleen B cells compared to virtually no expression in the T-cell compartment (**Supplementary Figure 1F**). As expected and as evidence of NF-κB activation, *Myd88^{L252P}* splenocytes over-expressed the NF-κB target gene *Tnfrsf10b* at the mRNA level (**Supplementary Figure 1G**).

Serum Protein Electrophoresis Profiles Segregate Myd88^{L252P} Mice According to Age

As a first exploratory step, serum protein electrophoresis (SPE) was systematically performed on a series of 40 *Myd88^{L252P}* mice and 26 age matched *Cd19^{Cre}* LMCs. As shown in **Figure 1A** three SPE profiles were seen: normal, polyclonal hyper gammaglobulinemia (hyper Ig) and a monoclonal Ig peak. All *Cd19^{Cre}* LMCs exhibited normal SPE regardless of their age. In other words, SPEs with hyper Ig or Ig peaks were found only in *Myd88^{L252P}* mice (**Figures 1A, B**). **Figure 1B** shows the relationship between the age of *Myd88^{L252P}* mice and the SPE

profile. Young *Myd88^{L252P}* mice (16-23 weeks) had a normal or hyper Ig SPE profile. In contrast, most mice older than 32 weeks had an Ig peak. In between these two groups, 24 to 31 week old mice (middle age) had a hyper Ig or an Ig peak in 65% and 35% cases respectively (Fisher test, $p=2.10^{-4}$). ELISA quantification of serum Ig revealed that young *Myd88^{L252P}* mice with a normal SPE exhibited a moderate IgM and IgG hyper Ig when compared to their *Cd19^{Cre}* LMC (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 2**). Serum IgG levels of middle aged and old *Myd88^{L252P}* mice were variable when compared to their young counterparts. This was in contrast to serum IgM levels that were significantly increased in middle aged mice and even more so in old mice and correlated with the SPE profile and age (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 2**).

These results first indicate that continuous MYD88 activation in B cells was associated with a global increase in Ig secretion. Second, age related occurrence of polyclonal hyper Ig and then monoclonal Ig peaks correlated with the increase in serum IgM levels. This suggests that, after a polyclonal expansion phase, aging of *Myd88^{L252P}* mice was associated with clonal restriction of IgM-secreting B-cells, very likely reflecting the MYD88^{L252P} B-cell transformation power in these cells. Therefore, these first results point to a strong relationship between MYD88^{L252P} and IgM-secreting B-cells.

Myd88^{L252P} Bone Marrow IgM Plasma Cell Content Was Increased and Displayed a CD138 Expression Continuum

As shown in **Figure 2A**, *Myd88^{L252P}* bone marrow global B-cell content was comparable to that of *Cd19^{Cre}* LMCs in terms of percentages in 16 week old mice with normal SPE. Transgene expression was mainly found in *Myd88^{L252P}* *CD19^{high}* B-cells. Indeed, with an on/off effect, percentages of YFP positive cells (*i.e.* of LoxP rearranged cells) was directly correlated with *CD19* mean fluorescence intensity (**Figure 2B**). Comparison of *CD19^{Cre}* LMC and *Myd88^{L252P}* mice did not reveal any significant bone marrow B-cell increase with age. However older *Myd88^{L252P}* mice had increased levels of IgM^{pos} *CD19^{high}* B-cells (**Figures 3A, B**, left panel and **Supplementary Figure 3** for the gating strategy). Strikingly, a CD138 expression continuum was clearly evident in a triple parametric B220/CD138/IgM histogram gated on mature B-cells and/or PCs in *Myd88^{L252P}* mice only (**Figure 3A**, lower panel see in red the decrease in B220 and the increase in CD138 expression). This CD138 expression continuum, that we recently showed to be characteristics of MYD88^{L265P} WM bone marrow tumor B-cells (Gayet et al, Cytometry B 2021), started from IgM^{high} CD138^{low} and ended at IgM^{low} CD138^{high} cells (**Figure 3A**, lower panel). This CD138 expression continuum was absent in *Cd19^{Cre}* LMCs. Consequently, *Myd88^{L252P}* mice showed increased percentages of both IgM^{high} CD138^{low} B-cells (most likely precursors of IgM PCs) and total bone marrow PCs (**Figure 3B**, right panel). Moreover, the proportion of bone marrow IgM PCs was significantly increased in young *Myd88^{L252P}* mice and even more in older *Myd88^{L252P}* mice (**Figure 3C**). Indeed, *Myd88^{L252P}* *CD19^{pos}/YFP^{pos}* B cells tended to accumulate in the

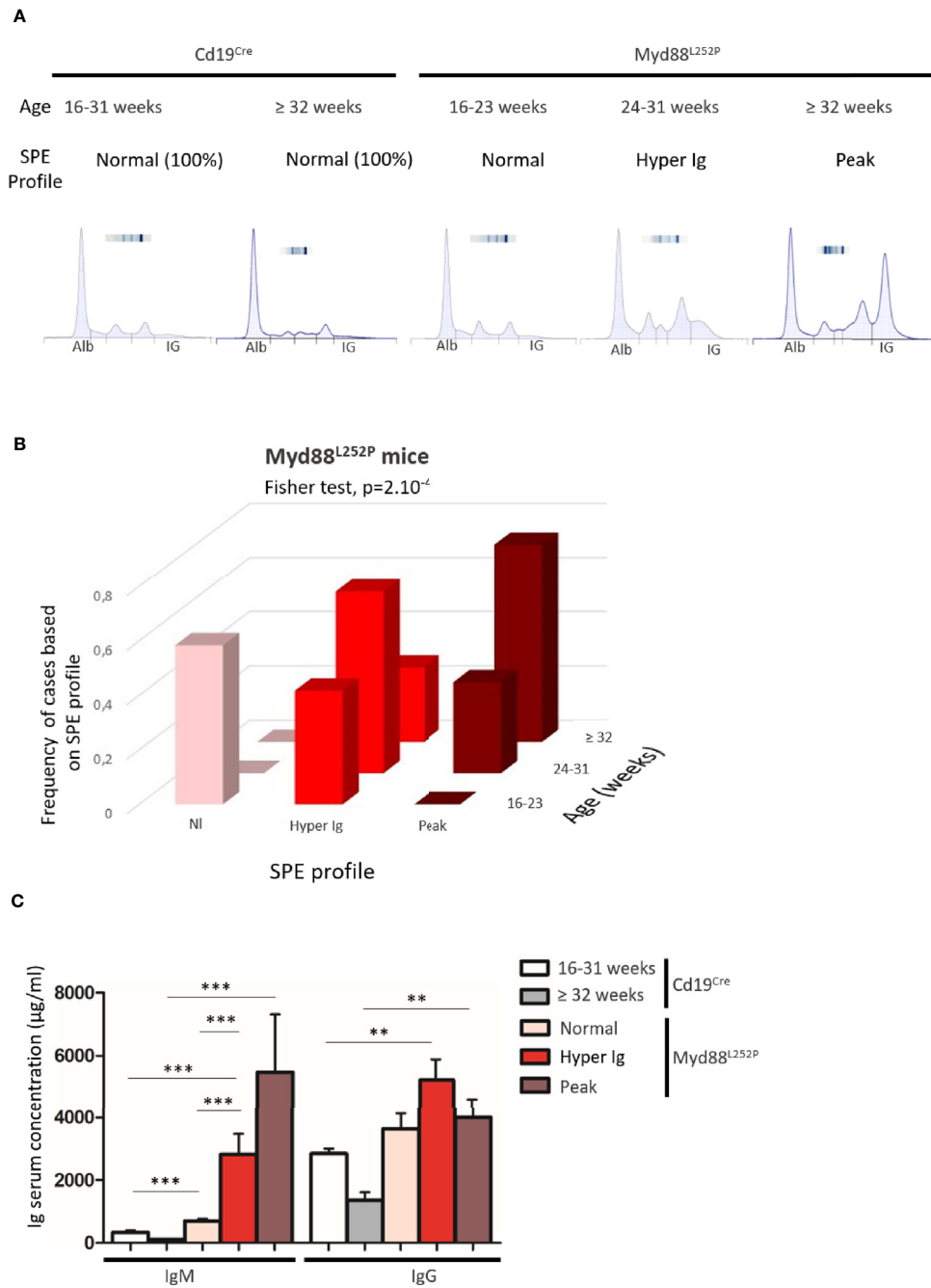


FIGURE 1 | Myd88^{L252P} transgenic mice exhibited serum IgM hypergammaglobulinemia and then monoclonal IgM peaks when ageing. **(A)** Examples of serum protein electrophoresis of Cd19^{Cre} mice (respectively 16 and 36 weeks-old) and three Myd88^{L252P} mice (16, 24 and 36 week-old) with normal, polyclonal hypergammaglobulinemia (hyper Ig) and monoclonal Ig peaks respectively. **(B)** Frequencies of cases according to SPE profile and age for Myd88^{L252P} mice (n = 40). **(C)** IgM and IgG serum levels in Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} mice. For Cd19^{Cre} (n = 15), Myd88^{L252P} (n = 36). Results are expressed as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and < 0.001 are symbolized by ** and *** respectively.

IgM^{high} B-cell compartment when compared to its Myd88^{L252P} CD19^{pos}/YFP^{neg} counterpart (**Supplementary Figure 4**).

Altogether, these results indicate that transgene expression started in a minority of CD19^{weak} B-cell precursors and was

mainly expressed at the latest stages of B-cell lymphopoiesis when CD19 expression was high. Evidence for bone marrow increase in both IgM^{high} CD138^{low} and PCs with the characteristic CD138 expression continuum may either suggest

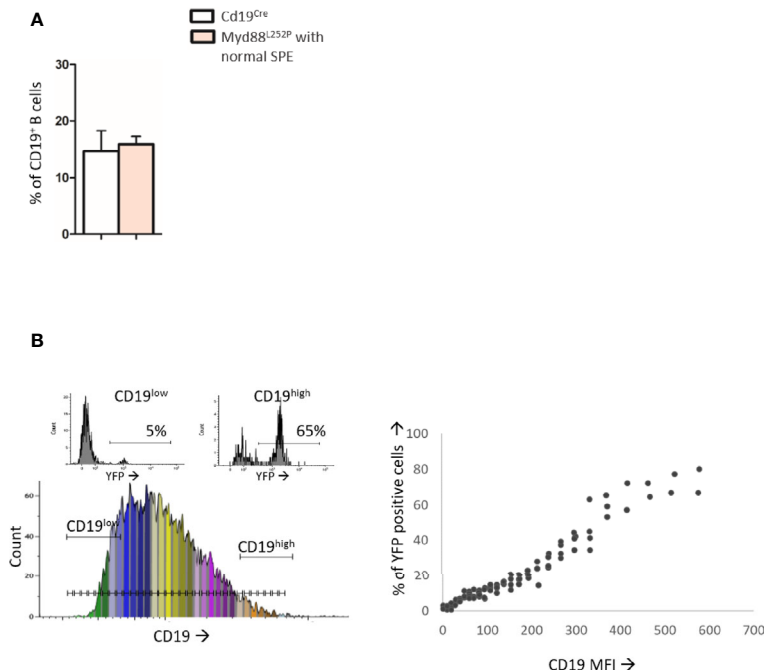


FIGURE 2 | Analysis of B-cell differentiation in bone marrow from 16 week-old Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} mice. **(A)**: Percentage of CD19^{pos} and/or B220^{pos} B-cells in bone marrow from 16 week-old Cd19^{Cre} (n = 9) and Myd88^{L252P} mice (n = 9). Results are expressed as the mean ± SEM. **(B)**: Flow cytometry analysis of the transgene expression according to CD19 expression levels (n=9). Left panel: CD19 monoparametric histogram sliced according to CD19 MFI intervals. For each CD19 MFI interval, the percentage of bone marrow B220^{pos} YFP positive cells was noted. Two examples of YFP monoparametric histograms are presented in the upper part, one for CD19^{low} B220^{pos} B-cells and one for CD19^{high} B220^{pos} B-cells with their respective percentages of YFP^{pos} cells. Right panel: percentage of YFP^{pos} B220^{pos} B-cells (Y axis) according to CD19 MFI (X axis).

that the bone marrow of Myd88^{L252P} mice had the ability to home IgM PC precursors and PCs and/or a shift in peripheral B-cell differentiation toward IgM PC in Myd88^{L252P} mice.

MYD88^{L252P} First Induced Peripheral Early Lymphoplasmacytic and Plasma Cells Expansion and Then B-Cell Transformation Into a Lymphoplasmacytic-Like Lymphoma

Extended white blood cell differential was not altered and mice did not exhibit any palpable/visible peripheral lymphadenopathy (data not shown) regardless of the SPE profile. Young Myd88^{L252P} mice with normal SPE tended to have spleen enlargement when compared to their age related Cd19^{Cre} LMCs (**Figure 4**). Spleen enlargement was dramatically increased in Myd88^{L252P} mice with hyper Ig and even more so in those with an IgM peak, a feature that was most likely related to B-cell transformation. Indeed, the B/T cell ratio was markedly increased in these latter mice (**Supplementary Figure 5**).

While spleen histology of young Myd88^{L252P} mice was comparable to that of their Cd19^{Cre} LMCs, with an apparent normal spleen architecture, Myd88^{L252P} mice with hyper Ig or an Ig peak exhibited enlarged and congruent lymphoid nodules (**Figures 5A–E**). At high magnification, a marked lymphoplasmacytic aspect

consisting of a mixture of small to large lymphocytes with numerous lymphoplasmacytic cells (LP cells) and PCs was noted in all Myd88^{L252P} mice whatever their SPE profile (**Figures 5F–J**). This spleen aspect was particularly striking for mice with Ig peaks, and was characterized by massive and diffuse infiltration of lymphoplasmacytic cells that evoked human B-cell lymphomas with features of PC differentiation, further called “LP-like lymphoma” or “LP-like tumors”. (see also the cytological imprint in **Supplementary Figure 6**). Presence of LP cells and PCs in Myd88^{L252P} spleen was invariably confirmed by immunohistochemistry after intracellular Ig labeling regardless of SPE status, with numerous LP cells and terminally differentiated PCs (cells with intermediate or strong intracytoplasmic Ig labeling respectively). Noteworthy, cell densities were markedly increased in Myd88^{L252P} mice with hyper Ig or with an Ig peak (**Figures 5K–O**).

Based on B-cell expression of CD21 and CD23, frequencies of CD21^{pos} CD23^{high} follicular B-cells were not significantly altered in Myd88^{L252P} mice regardless of their SPE status (**Figure 6A** and **Supplementary Figure 7**). In contrast, a decrease of CD21^{high} CD23^{pos} marginal zone B-cells was observed. This cell content nearly disappeared in Myd88^{L252P} mice with an Ig peak. Only total PCs were increased in these mice (**Figure 6B**). However, among total spleen PCs, percentages of IgM PCs were increased in a similar manner in all Myd88^{L252P} mice no matter what their SPE status was (**Figure 6C** and **Supplementary**

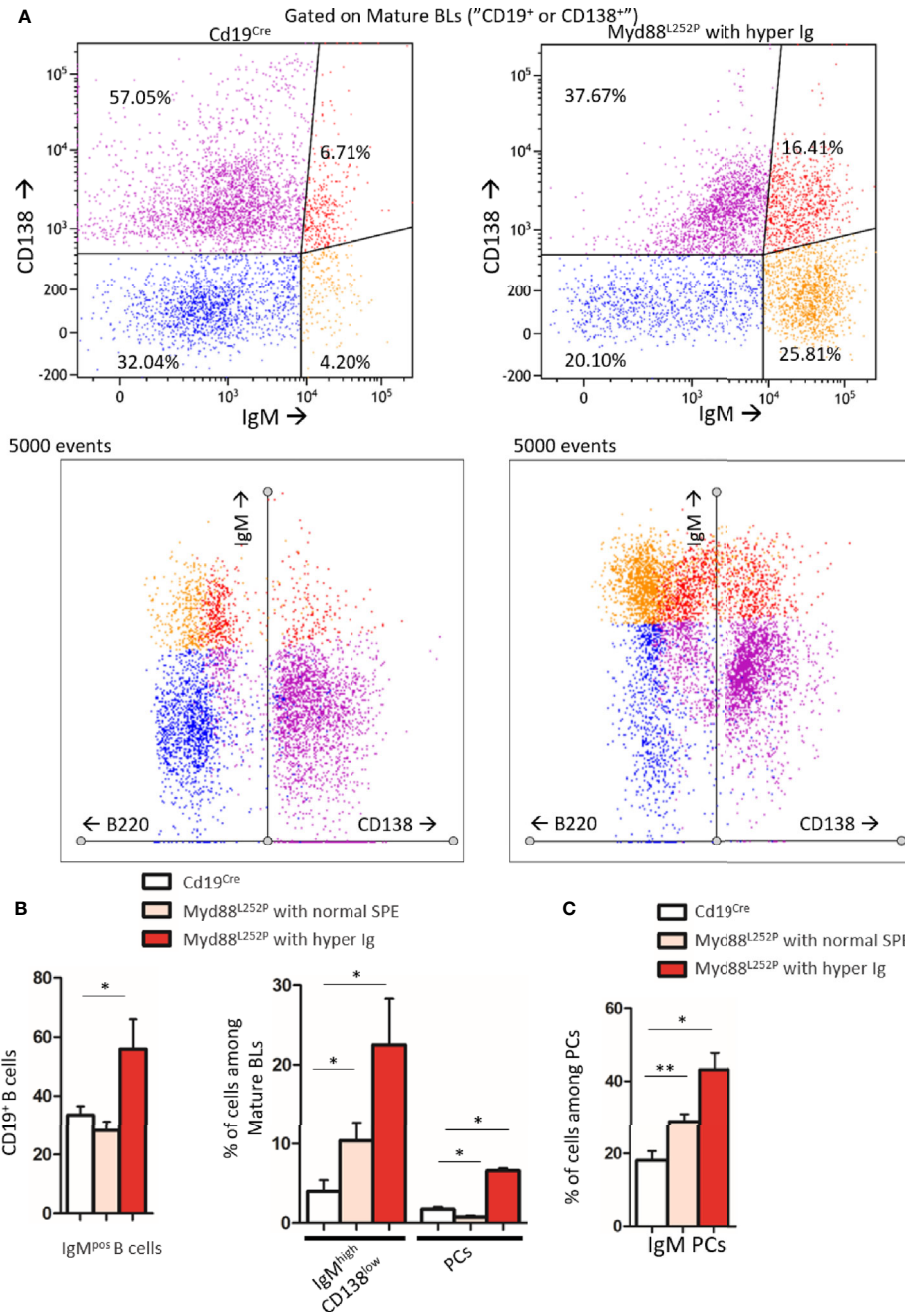


FIGURE 3 | Increase in the IgM PC compartment in bone marrow from Myd88^{L252P} transgenic mice. **(A)** Example of bi and triple parametric flow cytometry histograms gated on mature B or plasma cells for expression of IgM, B220 and CD138 for Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} mice (left and right panels respectively). Upper panels: IgM^{low} or neg CD138^{neg}, IgM^{high} CD138^{low}, IgM^{high} CD138^{high} and IgM^{low} CD138^{high} cells are colored in blue, orange, red and purple respectively using a hinged quadstat of the Kaluza software and an IgM/CD138 2-dimensional plot. The hinged quadstat was set-up for one Cd19^{Cre} mouse. Lower panels: triple parametric histograms using the radar function of the Kaluza software. Note the CD138 expression continuum on Myd88^{L252P} bone marrow B-cells that correlated with a progressive decrease in B220 expression. This CD138 expression continuum was virtually absent in Cd19^{Cre} mice. **(B)** Percentages of total IgM^{pos} B cells and IgM^{high} CD138^{low} pre PCs and B220^{low} CD138^{high} PCs in bone marrow from 16-24 week-old Cd19^{Cre} (n = 6) and Myd88^{L252P} mice with normal SPE or hyper Ig (n = 6 and n = 3 respectively). Results are shown as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 is symbolized by *. **(C)** Percentages of IgM^{pos} CD138^{high} PCs among total PCs in bone marrow from 16-31 week-old Cd19^{Cre} (n = 6) and Myd88^{L252P} mice with normal SPE or hyper Ig (n = 6 and n = 3 respectively). Results are shown as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 and < 0.01 are symbolized by * and ** respectively.

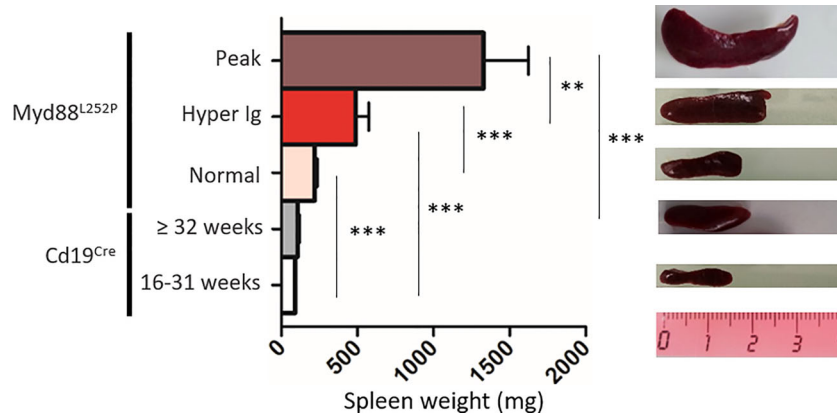


FIGURE 4 | Myd88^{L252P} mice exhibited a progressively increasing splenomegaly consistently related to the SPE profile. Spleen size of Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} age-paired mice. Myd88^{L252P} mice were sacrificed together with at least one Cd19^{Cre} mouse of the same age. Left panel: distribution of spleen weights; right panel: examples of spleen macroscopy (Cd19^{Cre} n = 9 for 16-31 weeks-old and n = 16 for ≥ 32 weeks; Myd88^{L252P} with normal SPE: n = 9; with hyper Ig: n = 13; with Ig peak: n = 19). Results are given as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and p-value < 0.001 are symbolized by ** and *** respectively.

Figure 7). Moreover IgM PCs were predominantly CD93^{neg} suggesting that they belonged to the proliferating PC compartment (27) (**Figure 6C** and **Supplementary Figure 7**).

Therefore, morphological and immunophenotypic results indicated that continuous MYD88 activation was associated with continuous peripheral IgM PC differentiation very early on and that these LP and PC subsets continuously expanded with age first being associated with hyper Ig and then with an Ig monoclonal peak and a LP-like lymphoma aspect in the spleen.

Proliferation Index of Myd88^{L252P} LP-Like Tumors Was Moderately Increased in Myd88^{L252P} Tumors With an LP-Aspect

To better study these Myd88^{L252P} LP-like tumors, we compared their Ki67 proliferation index to that of Cd19^{Cre} LMCs as well as to L.CD40, L.CD40/Δc-MYC mice as controls. L.CD40 mice are a model of marginal zone spleen B cell indolent lymphomas without plasma cell differentiation but with NF-κB activation (28). L.CD40/Δc-MYC mice are a model of ABC-DLBCLs with both c-Myc and NF-κB activation in B-cells (24). Very few Ki67 positive cells were seen outside germinal centers in spleen sections from Cd19^{Cre} mice (**Figure 7A** panel A). The Ki67 index was weak in L.CD40 mice (**Figure 7A** panel B). By contrast, the vast majority of cells from L.CD40/Δc-MYC tumors were Ki67 positive (**Figure 7A** panel C). Being moderately increased in young mice with a normal SPE, the Ki67 proliferative index was further enhanced in mice with hyper Ig and even higher in those with an Ig peak, but never reached the proliferation index levels of L.CD40/Δc-MYC tumors (**Figures 7A**, panels D–7 and **7B**). *In vivo* incorporation of BrdU was tested for four mice with an Ig peak and one with polyclonal hyper Ig. Results confirmed that the proliferation index was consistently increased (**Supplementary Figure 8**) albeit always less than 30% with this technique.

Altogether, these results show that MYD88^{L252P} expression in B-cells was responsible for progressive peripheral B-cell

expansion related to an early increase in B-cell proliferation. Mice with an Ig peak clearly exhibited a lymphoproliferative disease with a marked increase in proliferation index but with features of an LP-like lymphoma such as the presence of numerous LP cells and PCs.

Myd88^{L252P} Mice With Ig Peaks Developed IgM but Not IgG Monoclonal or Oligoclonal B-Cell Lymphomas With Expression of Both Membrane and Secretory Heavy Chain mRNA

Since Myd88^{L252P} mice had a global hyper Ig even if predominantly IgM, it was important to assess μ or γ chain clonality of tumor surface and secreted immunoglobulins at the molecular level. Six LP-like cases with monoclonal Ig peaks and five Cd19^{Cre} mice were studied. mRNA reverse transcription followed by RACE PCR with primers specific for either the membrane or secreted forms of mouse μ or γ heavy chains was performed, followed by high throughput sequencing (HTS) of the VDJ-Cμ or VDJ-Cγ region (**Figure 8A**). **Figures 8B, C** show the relative frequency of the five most abundant mRNA clones for the μ or γ heavy chains respectively. RACE PCR and HTS results indicate that Myd88^{L252P} mice developed clonal or oligoclonal B-cell expansion with expression of both secreted and membrane forms of the μ heavy chain that had the same VDJ-Cμ clonal rearrangement (**Figure 8B**), without any bias in terms of V segment usage (not shown). The same RACE PCR technique with primers specific for either the membrane or secreted form of the mouse γ heavy chain did not identify any significant B-cell clonal expansion in Myd88^{L252P} tumors (**Figure 8C**).

These results indicate that, despite initial IgM and IgG hyper Ig in young Myd88^{L252P} mice, MYD88^{L252P} specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with clonal expression of both membrane and secreted μ chain isoforms identical VDJ gene rearrangements. These results are in full agreement with the

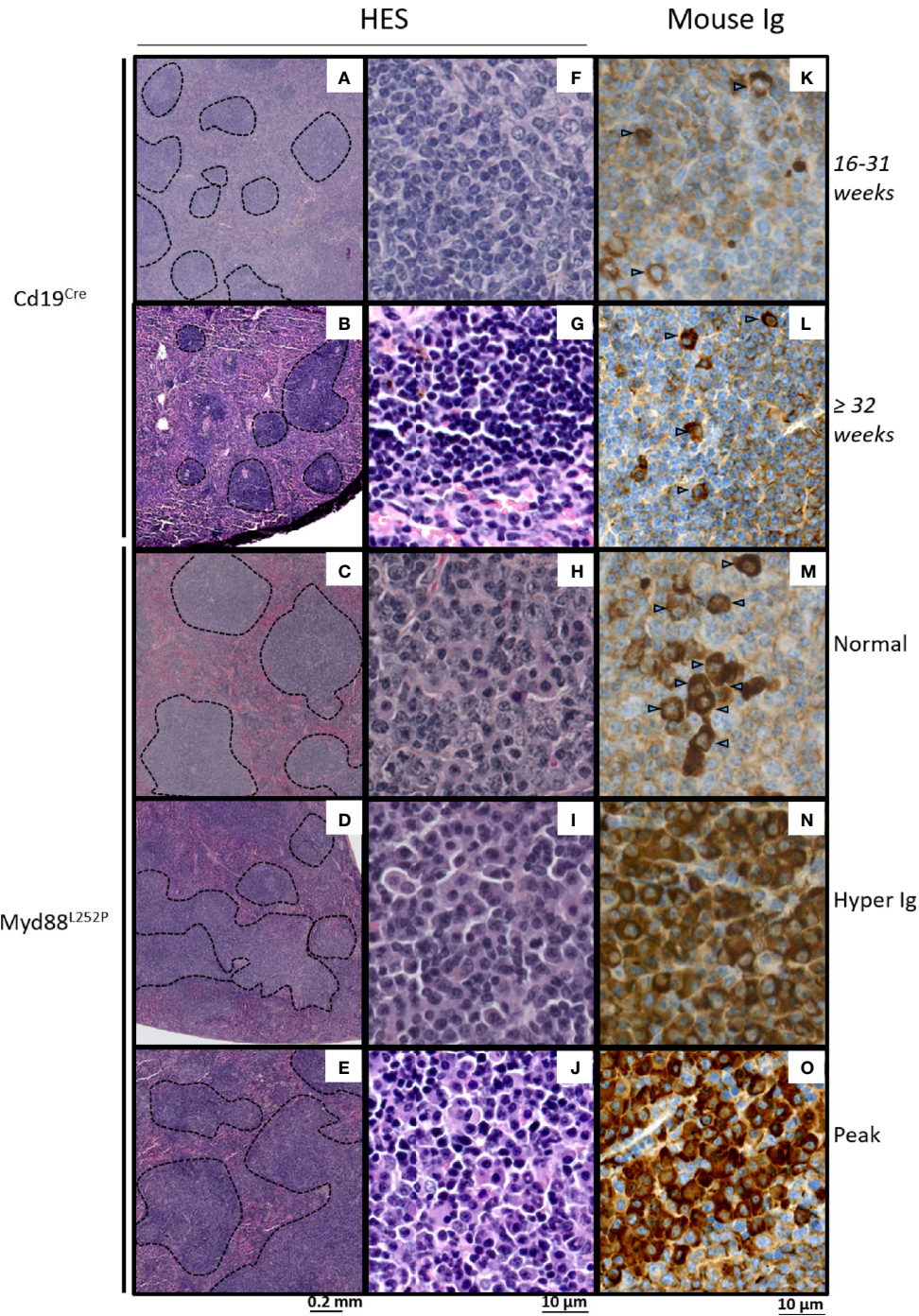
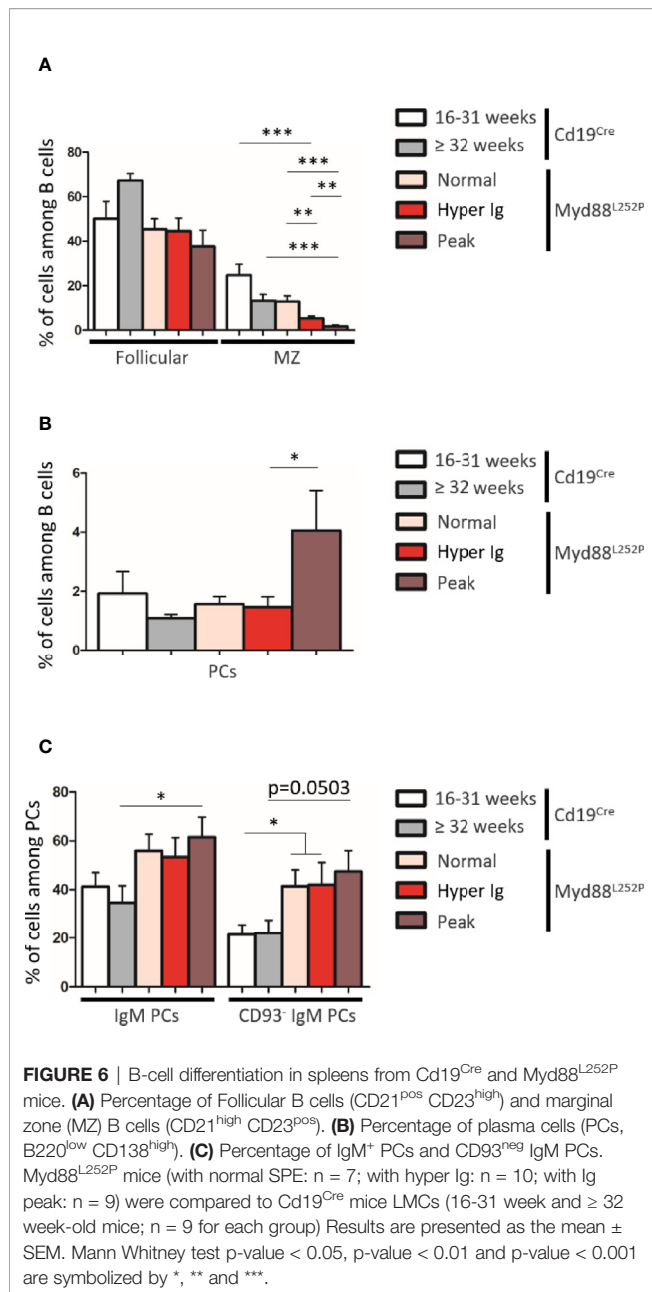


FIGURE 5 | Morphological and immunophenotypic plasma cell engagement of Myd88^{L252P} tumors. Hematein eosin morphological aspect (A–J) and intracytoplasmic Ig labeling (K–O) of Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} spleens: one 16–31 week-old Cd19^{Cre} (A, F, K), one ≥ 32 week-old Cd19^{Cre} (B, G, L) and three Myd88^{L252P} (C, H, M) for Normal group, (D, I, N) for Hyper Ig group and E, J, O for Peak group) mice are shown. Panels (A–E) at low magnification, Myd88^{L252P} tumors often exhibited a nodular pattern (C–E). Panels (F–J): at high magnification, most Myd88^{L252P} tumors had small B-cell aspects with marked lymphoplasmacytic engagement (panels H–J). Panels (K–O) Myd88^{L252P} tumors with a lymphoplasmacytic aspect exhibited marked plasma cell differentiation as revealed by the presence of intracytoplasmic Ig in numerous cells (arrows) with various labeling intensities (M–O).



lymphoplasmacytic aspect Myd88^{L252P} tumors and the persistent IgM plasma cell differentiation continuum.

Transcriptomic Signature of Myd88^{L252P} LP-like Tumors Revealed NF- κ B RelA Activation, Proliferation and Plasma Cell Differentiation and Overlapped With Waldenström's Macroglobulinemia Gene Expression Profile (GEP)

To explore the transcriptomic signature of Myd88^{L252P} LP-like tumors in conditions similar to those of most studies on human B-cell lymphomas and to look for common features with WM,

we selected a short series of massively invaded Myd88^{L252P} spleen tumors with monoclonal Ig peaks. Comparisons were first done with their Cd19^{Cre} LMCs, and then with WM patients.

With a fold change of 2, a set of 1515 differentially expressed genes were found in Myd88^{L252P} spleen tumors when compared to spleens from Cd19^{Cre} LMCs (**Supplementary Table 3**). To analyze this set of genes, we combined both K-mean and hierarchical clustering and principal component analysis, as already published (29). Following this methodology, deregulated genes in Myd88^{L252P} spleen tumors could be segmented into 14 classes of co-regulated genes (**Figure 9** with methodological details in **Supplementary Materials and Methods, Supplementary Figure 9** and **Supplementary Table 4**). Consistent with increased B/T ratios in Myd88^{L252P} LP-like tumors, expression of genes belonging to the T-cell lineage, as well as T-cell signaling and activation signatures was down-regulated in Myd88^{L252P} spleen tumors (**Figure 9**, see clusters I, K and L). Of note, RelB signature was associated with that of T-cells and was decreased in Myd88^{L252P} spleen tumors. In contrast, expression of genes belonging to the proliferation, RelA NF- κ B activation pathway and plasma cell differentiation signatures were up-regulated (**Figure 9**, cluster J mainly as well as cluster B, G and M for proliferation).

To identify MYD88^{L252P} deregulated genes in common with those of WM patients having the MYD88^{L265P} mutation, transcriptomes of Myd88^{L252P} tumors were compared to those of purified WM bone marrow B-cells from a series of 11 MYD88^{L265P} WM patients. A subset of 319 coherently dysregulated genes in both Myd88^{L252P} LP-like tumors and WM tumor B-cells (163 up and 156 down, **Supplementary Tables 5, 6**) was extracted from the 1515 differentially expressed genes in Myd88^{L252P} LP-like tumors. Unsupervised hierarchical clustering showed a 95% coherency between the branches of up and down regulated genes in both WM tumor B-cells and LP-like Myd88^{L252P} spleen tumors (**Figure 10A**, left and middle panels and **Supplementary Tables 5, 6**). To check whether this Myd88^{L252P}/WM signature could discriminate WM from other indolent NHLs, an independent series of 58 patients, including 15 MYD88^{L265P} WM, five MYD88^{wt} WM, 12 MYD88^{wt} NMZLs and 19 MYD88^{wt} CLL was analyzed (**Supplementary Tables 2, 7**). All MYD88^{L265P} WM patients clustered together after unsupervised hierarchical clustering (**Figure 10A**, right panel and **Supplementary Tables 7, 8**). Also belonging to the MYD88^{L265P} WM cluster were 3/5 (60%) MYD88^{wt} WM and 2/12 (17%) MYD88^{wt} NMZLs. We used the linear predicting score described by Wright et al. (31) to estimate the informativeness of the Myd88^{L252P}/WM signature for WM diagnosis. As shown in **Figure 10B**, as set of 174 genes (84 up and 90 down, **Figure 10B**) was found to predict WM with over 90% probability (**Supplementary Tables 9, 10**).

The plasma cell signature was the main component of the Myd88^{L252P}/WM GEP. Genes such as *EDEM1* and 2, *IRF4* or *XBPI* were over-expressed while others such as *PAX5* or *BCL6* were markedly down-regulated (**Figure 10**). Consistently, functions revealed by Gene Set Enrichment analysis mainly corresponded to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus

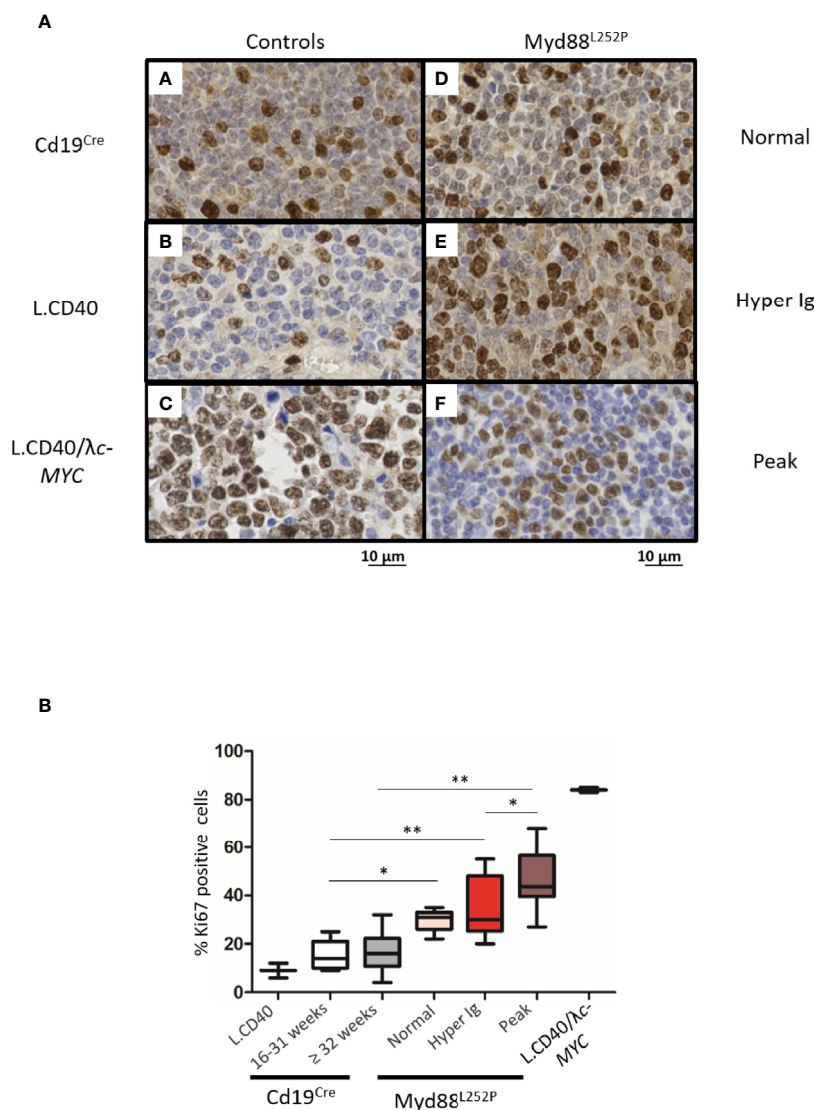
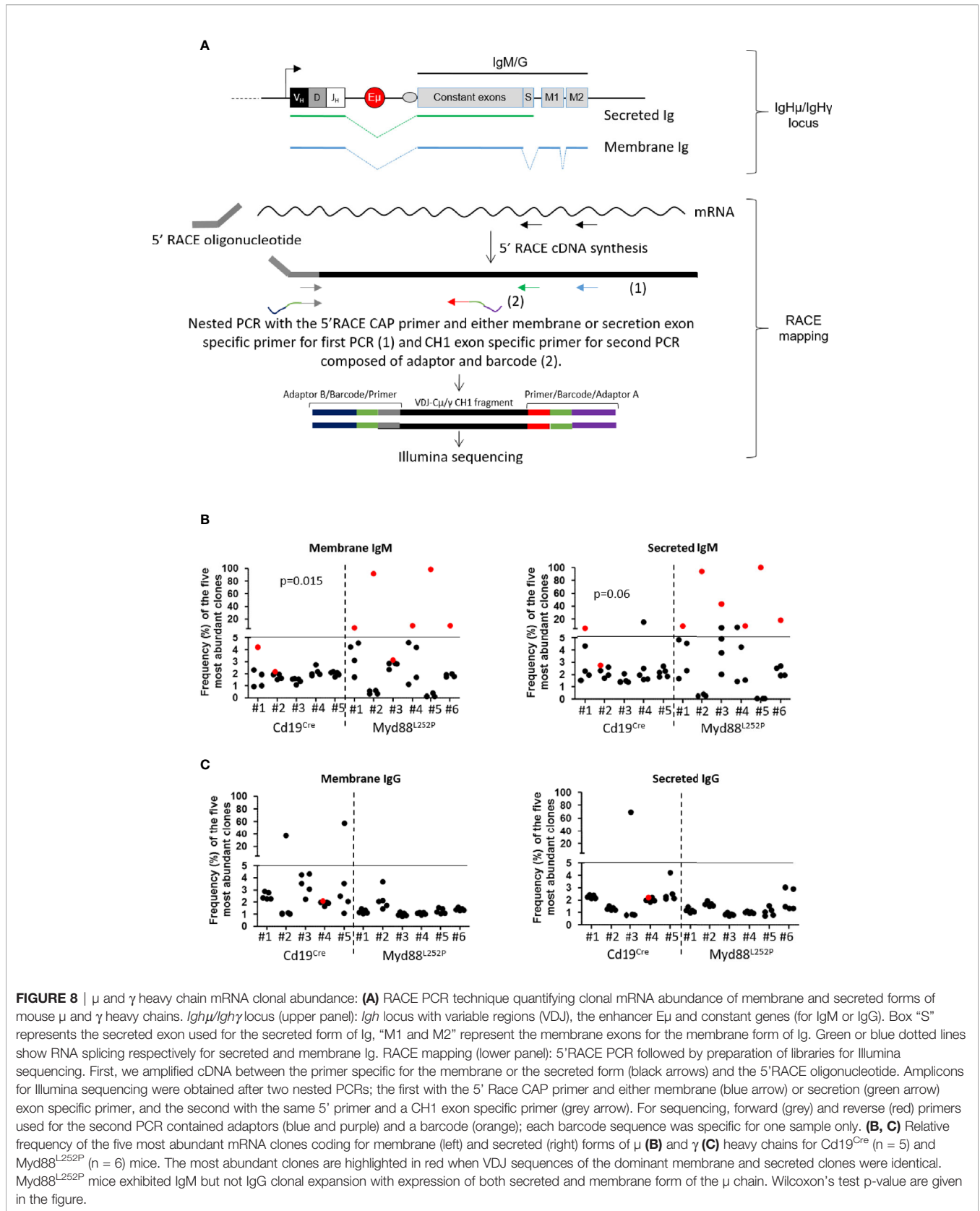


FIGURE 7 | Intermediate increase in Myd88^{L252P} tumor proliferation rate. **(A)** Examples of Ki67 labeling in spleen sections from three controls (panels A-C) and three Myd88^{L252P} mice (panels D-F, n=28). Controls were Cd19^{Cre} LMCs (panel A, n = 5 for 16-31 week-old mice and n = 8 for ≥ 32 week-old mice), L.CD40 mice (panel B) with indolent splenic lymphomas of marginal zone B-cells (n=2), as well as L.CD40/λc-Myc mice (panel C, n=2) with a ABC-DLBCL lymphomas (24, 28). The three Myd88^{L252P} tumors (panels D-F) are one representative example of each group defined according the SPE profile (normal n = 5, hyper Ig n = 8 and Ig peak n = 15). Here, L.CD40 mice were used as a model of indolent B-cell lymphoma with a low proliferation index while L.CD40/λc-Myc mice were a model of aggressive B-cell lymphoma with a high proliferation index. **(B)** Quantification of Ki67 labeling. Box plots represent the median and quartile of percentages of Ki67 positive cells. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value < 0.01 are symbolized by * and ** respectively.

(not shown). In accordance with results published by Hunter et al. (30), expression of genes such as *CXCR4*, *DUSP22*, *PIM1* and 2 or *TRAM1* was increased while expression of *SNED1* was decreased. Few genes of the Myd88^{L252P}/WM signature overlapped with those of ABC/GC DLBCLs published by Wright et al. (31). These overlapping genes, corresponding only to those that are overexpressed in ABC DLBCLs, were *IRF4*, *IGHM*, *CXCR4*, *P2RX5*, *PIM1* and *PIM2*. In other words, the Myd88^{L252P}/WM signature did not significantly overlap with that of GCB DLBCLs. Among other deregulated genes were cyclin kinase inhibitors *CDKN1B* (*p27^{kip1}*) and *CDKN2C* (*p18/*

INK4AC), mutations of the former being found in hairy cell leukemias (32). *RASSF3* and *KRAS* were also up-regulated. *RASSF3* belongs to the Ras association domain family (RASSF).

Altogether, the Myd88^{L252P} tumor signature highlights proliferation as well as canonical NF-κB p65/RelA activation (but not RelB), which is in agreement with the known fact that MYD88 activates the classical NF-κB pathway. The Myd88^{L252P} tumor signature also strikingly confirms that lymphoplasmacytic differentiation is at the heart of MYD88 related B-cell transformation in mice, a feature shared with WM tumors with the MYD88^{L265P} mutation.



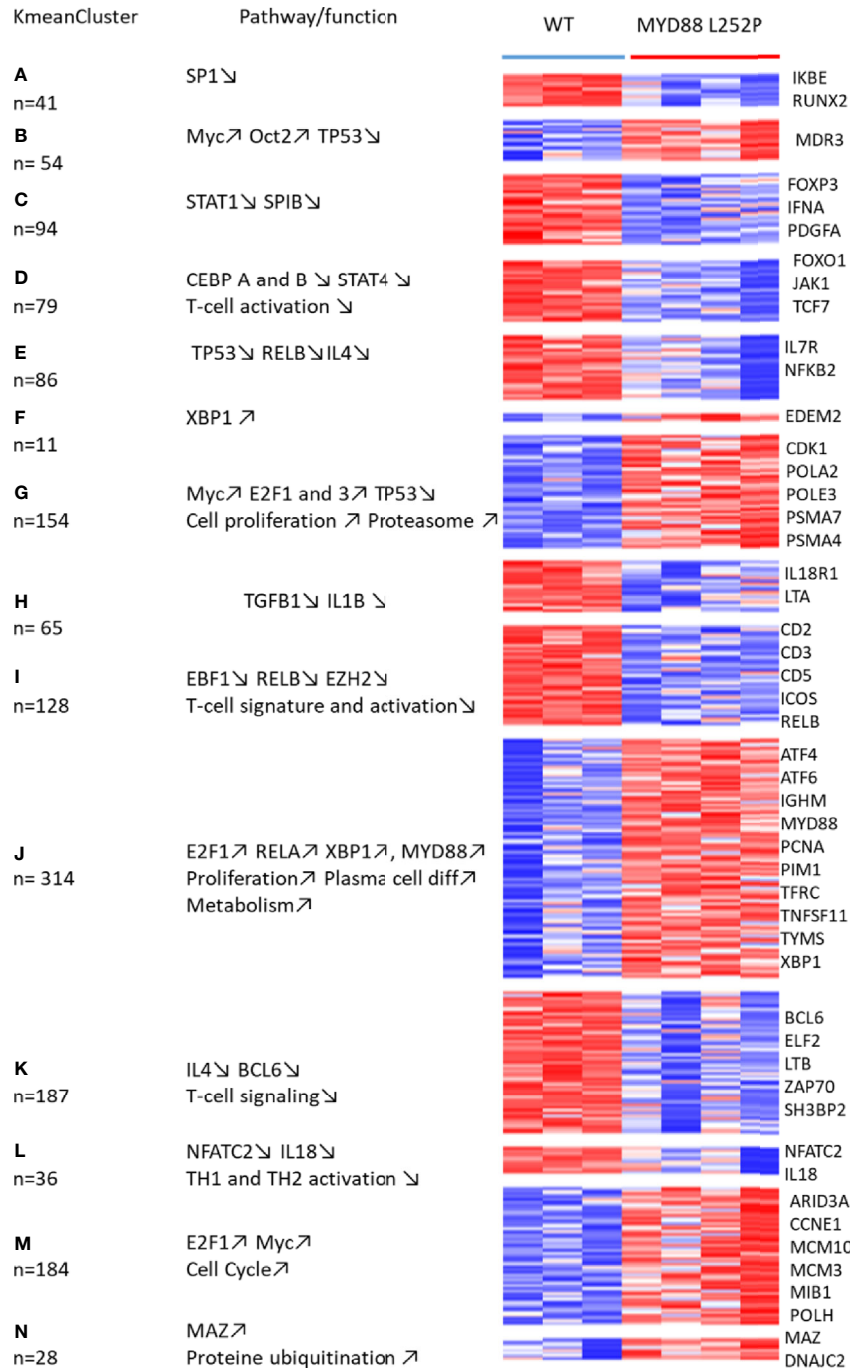


FIGURE 9 | Whole transcriptome analysis of Cd19^{Cre} and Myd88^{L252P} mice: total mRNA was extracted from whole spleen tissues. Gene expression profiles were obtained using the MoGene-2_1-st-v1 Affymetrix chip. mRNA transcripts (3236) were selected to be differentially expressed using the Limma R package. Expressed genes that were too heterogeneous were eliminated, resulting in a final selection of 1515 genes. These genes were segregated into 40 Kmean clusters. The closest Kmean clusters were merged 2 by 2 according to their proximity by principal component analysis of the mean vectors. This was repeated until maximization of the absolute value of Chi2 (29). This resulted in 14 aggregated clusters. Functional annotation of the aggregated Kmean clusters was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software. Annotated heatmap of the 1515 genes are segregated into the 14 aggregated clusters. Left: the aggregated Kmean clusters with the corresponding number of genes; middle: main pathways and or function identified with the IPA software; right: some relevant genes.

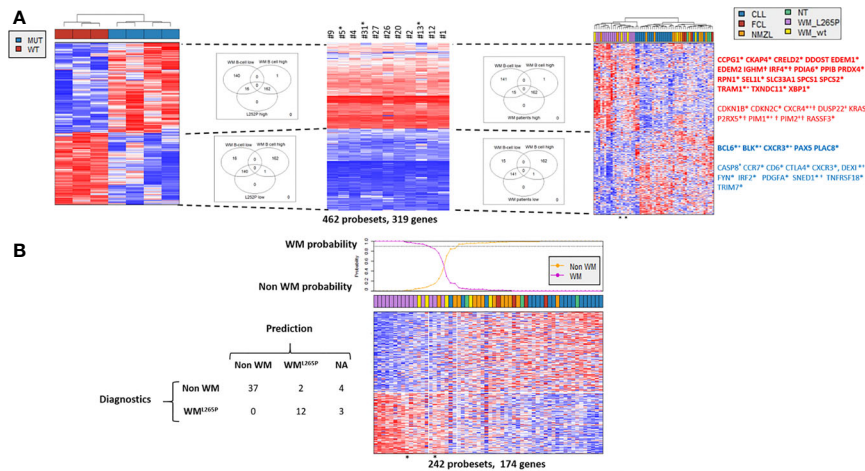


FIGURE 10 | Comparison of gene expression profile (GEP) of Myd88^{L252P} mice and patients with WM or other indolent B-cell NHL. Affymetrix differential gene expression profiles (GEP) between four Myd88^{L252P} mice (MUT, n=4) and three Cd19^{Cre} mice (WT, n=3) were compared to the Affymetrix GEP of purified bone marrow tumor B-cells from 11 WM patients with the MYD88^{L265P} mutation, resulting in selection of 462 probesets (319 genes). This selection was used on the Affymetrix transcriptome of an independent series of lymph node biopsies from 58 patients: 19 MYD88^{wt} chronic lymphocytic leukemias (CLL), 15 MYD88^{L265P} WM (WM_L265P), 12 MYD88^{wt} nodal marginal zone lymphomas (NMZL), 5 MYD88^{wt} WM with IgM peaks (WM_WT), 4 follicular lymphomas (FCL) and 3 patients with follicular hyperplasia (NT). **(A)** Hierarchical clustering and heatmap of the 462 selected probesets for mice (left), purified bone marrow MYD88^{L265P} WM B-cells (middle) and lymph nodes (right). Down and up-regulated genes are in blue and red respectively. Branches of down and up regulated genes in Myd88^{L252P} mice, MYD88^{L265P} WM bone marrow B-cells and MYD88^{L265P} WM lymph nodes are delineated by dashed lines. Venn diagrams of the intersections between the branches are shown, highlighting the consistency between branches across the different clustering. Some genes of interest are noted on the right. In bold are those of the plasma cell signature; *: genes in the predictor (see **Figure 7B**); +: genes reported by Hunter et al. in WM (30); †: genes of the ABC/GC DLBCL signature (31). **(B)**: Informativeness of MYD88^{L265P} WM diagnosis using the 462 selected probesets defined in **Figure 8A**. The 462 probesets defined from MYD88^{L252P} mice and bone marrow tumor B-cells from MYD88^{L265P} WM patients were used to predict MYD88^{L265P} WM diagnosis (WM^{L265P} versus non WM) from other lymphomas within the series of 58 lymph node biopsies. Probabilities that each sample belongs to WM^{L265P} versus non WM group are indicated. The WM^{L265P} versus non WM or not attributed (NA) assignment is shown on the left.

DISCUSSION

Different mouse preclinical models with continuous MYD88 activation in B-cells have been published; All but one demonstrate the B-cell transformation potential of MYD88 but without presenting evidence for a correlation between IgM B-cell LP and PC differentiation (13–15). The first report was published by Knittel et al. (14). The authors generated a mouse model that allows B-cell conditional expression of the Myd88^{L252P} allele from the endogenous Myd88 locus. In this model, expression of Myd88^{L252P} would be regulated in a manner similar to that of the wild type allele. At least three regulatory levels of MYD88 activity have been reported. The MYD88 regulatory region harbors various transcription binding sites such as those for NF-κB, IRF1, SP1 or STAT factors and it was shown that this gene is regulated by IL-6 (33), which suggests a role for its expression in either plasma cell differentiation or inflammation. An alternative splice variant of MYD88, MYD88s, lacks exon 2 and is unable to activate NF-κB. This variant is also able to form a heterodimer with the full length MYD88 protein, resulting in decreased formation of the myddosome complex (34). MYD88s is increased during sepsis and is thought to ensure robust termination of MYD88 dependent inflammation (35, 36). As a third regulation mechanism, hypomethylation and upregulation of MYD88 are important for NF-κB activation (37). MYD88 promoter demethylation is important in glioblastoma and

is associated with increased MYD88 protein expression in lung cancers (38, 39). Mice from Knittel's model occasionally developed DLBCLs when they aged. Therefore, the Knittel mouse model raises the question of the relationship between B-cell lymphomagenesis and regulation of the endogenous Myd88 locus throughout B-cell life. In addition, this model also showed hyper Ig, even if polyclonal, which may suggest that expansion of Ig secreting B-cells could precede the lymphoma development. In that view, K Schmidt et al. recently published a mouse model with a transgene closed to the one of the Knittel's model. But, after exploring the effect of MYD88 activation in three different Cre context, Cd19-Cre, Cγ1-Cre and Cd19-Cre^{ERT2}, as well as analyzing the effect of NP-immunization, the authors concluded that MYD88 continuous activation promotes survival of long term IgM expressing B-cells with clonal restriction a monoclonal serum IgM paraprotein resulting in an IgM MGUS-like disorder (16).

To our knowledge, two papers, from Wang et al. and Sewastianik et al. reported the effect of the human MYD88^{L265P} protein in murine B-cells (15, 40). In the model of Wang et al, primary murine B-cells were retrovirally infected *ex vivo* before reinjection. In this model, an initial boost of B-cell proliferation was seen followed by B-cell apoptosis in a Bim-dependent manner. Importantly, no increase in immunoglobulin secretion was reported. Beside the fact that retroviral infection of B-cells may have its own interfering effects, this model raises the question of whether the human MYD88^{L265P} protein may have exactly the

same activation properties on a mouse B-cell background as in human B-lymphocytes. In the model of Sewastianik et al, the human loxP-flanked-stop-MYD88^{L265P} transgene was inserted downstream from the mouse *Collagen type I alpha 1 chain* (*Col1A1*) gene and MYD88^{L265P} expression was induced by crossing with *Aid^{Cre}* mice (15). In addition to focal skin rashes, some WM features were noted such as expansion of lymphoplasmacytic cells and increased IgM serum levels. However, only DLBCL clonal transformation was seen. Because AID is mainly expressed in germinal center B-cells and because the promoter of the *Col1A1* gene is highly active in fibroblasts and osteoblasts (41), this model raises the question whether temporality and/or expression pattern could be important in MYD88 driven B-cell lymphomagenesis.

The *Rosa26* locus has been solidly proven to be valuable for expression of numerous oncogenes in the B-cell lineage (see reference (42) for discussion as well as the literature of the K Rajewsky's group). By inserting our *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* transgene in this locus, we forced continuous expression of the mutated MYD88 protein in a heterozygous-like context while respecting the native MYD88 activation pathways of mouse B-cells. Moreover, we were able to monitor our transgene expression by flow cytometry due to YFP. Thereby, we created a conditional *Myd88^{L252P}* mouse model closed to the one published by Jo et al. (13). However, these authors mainly focused their work on the synergy between MYD88 and the catalytic subunit HOIP which increases LUBAC ligase activity that in turns promotes NF- κ B canonical activation; only four so-called CD19-cre-MYD88LP have been studied at the tumor stage.

Here, a longitudinal analysis of a series of 40 *Myd88^{L252P}* mice compared to their age matched Cd19^{Cre} LMCs demonstrated that IgM plasma cell expansion is at the heart of MYD88 dependent B-cell transformation. Indeed, by examining clonal restriction of IgM secreting B-cells, we first showed that ageing of *Myd88^{L252P}* mice was associated with polyclonal hyper Ig followed by monoclonal Ig peak due to increased serum IgM. Second, we provide evidence indicating that bone marrow relocation of IgM B-cells, IgM^{high} CD138^{low} cells and IgM PCs was increased in *Myd88^{L252P}* mice with a CD138 expression continuum, that is a characteristic of WM tumor B-cells. Third, analysis of spleen morphology and spleen B-cell subsets by flow cytometry indicated that continuous MYD88 activation was associated very early with peripheral LP cell and CD93^{neg} IgM PC expansion and that these cell subsets were markedly increased at the time of the Ig monoclonal peak. Fourth, appearance of a monoclonal Ig peak was constantly associated with a B-cell lymphoma with marked features of lymphoplasmacytic differentiation, so-called *Myd88^{L252P}* LP-like lymphoma. Fifth, at the molecular level, *Myd88^{L252P}* specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with mRNA clonal expression of both membrane and secreted μ (but not γ) chain isoforms. Finally, the *Myd88^{L252P}* tumor gene expression profile not only highlights the canonical NF- κ B p65/RelA activation pathway and proliferation, but also strikingly shares an *Xbp1* centered lymphoplasmacytic B-cell differentiation signature with

MYD88^{L265P} WM. This signature differentiates MYD88^{L265P} WM from other indolent B-cell tumors including marginal zone lymphomas. Our results contradict the conclusions of Sewastianik et al. (15), and, being in line with those of K Schmidt et al. (16), firmly demonstrate the specific transforming effect of MYD88 activation in IgM PC differentiating B-cells.

To establish the gene expression signature from bulk *Myd88^{L252P}* spleen tumors rather than from purified B-cells is matter of discussion. The very obvious disadvantage of working on bulk tumors is certainly that all mRNA species from all cell types present in the tissue are mixed together. Even if massively invaded, both stromal and other residual immune cells (T-cells, macrophages, dendritic cells...) persist constantly in the tumor. In these conditions, specifically assigning a given mRNA expression pattern to tumor cells is always hazardous. However, because tumors were immediately snap-frozen, all mRNA species are supposed to be well preserved without any significant experimental bias. On the other hand, working on purified cells may also induce artefacts since the abundance of different mRNA species may vary during the time of purification which can also stress the cells. Above all, in the specific case of *Myd88^{L252P}* spleen tumors, which exhibit an LP aspect with continuous PC differentiation, the key question would have been to choose the right negative selection marker. Indeed, tumor cells are phenotypically heterogeneous with variable expression of B220, surface Ig or CD138 for example. Should we have selected B220^{high} versus B220^{low} B-cells or CD138^{low} versus CD138^{high} cells? Rather than make wrong or partial choices concerning which tumor cells to purify, we chose to work on bulk *Myd88^{L252P}* spleen tumors with well-preserved total mRNA and to compare this bulk signature to that of WM, including purified WM bone marrow tumor B-cells.

One characteristic feature of *Myd88^{L252P}* B-cells was the strong reduction of the marginal zone B-cell compartment. While also characterized by continuous activation of NF- κ B, the L.CD40 mouse model published by Hömig-Hözel et al. (28), in which B-cells are submitted to continuous CD40 activation signaling, showed expansion of marginal zone B-lymphocytes. This points out the differences between TLRs and CD40 in terms of NF- κ B activation. Indeed, CD40 is able to activate both the classical and alternative pathways, i.e. to induce the nuclear translocation of RelA and RelB NF- κ B containing complexes while TLRs only activate the classical pathway. The effect of both pathways as well as the strength of NF- κ B activation on B-cell fate has been extensively discussed by Pillai et al. (43). In this review, the authors also indicate that BTK activation blocks the Notch signaling pathway that is essential for marginal zone B-cell differentiation. It turns out that Hunter et al. have shown that *Myd88* is able to activate BTK in a BCR independent manner (30), which consequently could repress B-cell maturation toward the marginal zone B-cell lineage.

Gene expression profiles of LP-like *Myd88^{L252P}* tumors distinctly suggest the involvement of RelA rather than RelB. RelA, but not RelB, is clearly associated with EBV-dependent B-cell immortalization and with EBV-associated DLBCL tumors, which exhibit a phenotype close to that of ABC-DLBCLs (25).

RelA is also essential for development of GC-derived PCs (44) and immunohistochemistry detected nuclear RelA in WM B-cells (45). Indeed, LP-like Myd88^{L252P} B-cell tumors shared strong overlaps with human WM in terms of gene expression profile. Even if a few genes were in common with the ABC-DBCL signature such as *IGHM*, *CXCR4* or *PIM1* and *PIM2*, the Myd88^{L252P}/WM signature points to dysregulation of plasma cell differentiation as the keystone of MYD88 transforming physiopathology. It also suggests that *KRAS* activation could be important. *RASSF3* and *KRAS* itself were up-regulated in both Myd88^{L252P} B-cell tumors and human WM. Consistently, and in agreement with results from the group of Treon (30), we also found *RASSF6* overexpression in WM patients (NG and JF unpublished results). *CXCR4*, whose expression is increased in WM, may activate the RAS pathway through RasGAP-associated proteins (46). The most frequent mutations involve *KRAS* and *NRAS* genes in multiple myeloma (47). Even if such mutations have not been reported in WM (6), our results highlight the putative role of the Ras activating pathway in WM, which may lead to the design of novel therapies.

Despite similarities between WM and Myd88^{L252P} LP-like tumors such as serum Ig monoclonal peak, increase in IgM prePCs, PC bone marrow relocation and marked lymphoplasmacytic differentiation of tumor cells some major differences exist. The first difference, is the predominant site of tumor involvement. Even if splenomegaly is found in 20% of bona fide WM patients, it is largely admitted that bone marrow is the primary tumor site. In contrast, Myd88^{L252P} LP-like mouse tumors mainly developed in the spleen. Physiologically, IgM PCs tend to reside mainly in the spleen whereas switched IgG PCs migrate to the bone marrow (48). This raises the question of why WM IgM tumor B-cells migrate to bone marrow. In that view, it is largely suspected that *CXCR4* mutation could play a role in bone marrow homing. Further studies could also evaluate the transforming potential of Myd88 by adoptive transfer of LP-like tumor B-cells. Whether the transferred tumor will retain the lymphoplasmacytic aspect would also be interesting.

Another significant difference is the presence of large cells and increased proliferation in Myd88^{L252P} LP-like mouse tumors. The increased proliferation index was an early event since it was also found in young Myd88^{L252P} mice with normal SPE. As we previously discussed (24), only three mouse models for indolent lymphomas of the spleen have been published, one mimicking TRAF3 inactivation, the second with constitutive expression of BCL10 and the last one with continuous CD40 signaling (the L.CD40 model that we used as a control in **Figure 7**) (28, 49, 50). These three models are characterized by increased RelB activation. We previously demonstrated that immune surveillance may influence morphology and proliferation in the L.CD40 model. In this model, immunosuppression led to transformation of small indolent B-cell L.CD40 tumors into large B-cells with increased proliferation. Reactivating the anti-tumor response using anti-PD-L1 immunotherapy led to tumor regression (51, 52). These results on this mouse model suggest that the immunologically silent “indolent phenotype” of a B-cell tumor could be related to the immune pressure exerted on tumor B-cells. Whether and how activation of the alternative and canonical NF-κB pathways

differently disturb immune surveillance remains to be determined, and comparison of both L.CD40 and Myd88^{L252P} mouse models could provide answers. However, as in the L.CD40 tumor model and in spleen marginal zone lymphomas (52, 53), the PD1/PD-L1 axis is most likely playing a role in the immune escape of aggressive tumor B-cells with MYD88 activation. Using Eμ-*MYC* transgenic hematopoietic stem cells (HSC) stably transduced with naturally occurring NF-κB mutants to generate various primary mouse lymphomas, Reimann et al. recently showed that MYD88 tumors express high levels of PD-L1 and that anti-PD-1 therapies induce T-cell dependent senescence of tumor cells (54). PD-L1 surface expression is weak or absent on WM tumor B-cells. However soluble PD-L1 serum levels are increased in WM patients and PD-L1 is upregulated by IL6 (55).

In summary, our longitudinal study of Myd88^{L252P} mice demonstrated that continuous MYD88 activation is able to promote early expansion of IgM LP cells and PCs with, first, serum polyclonal hyper Ig and then a monoclonal Ig peak. Ig peaks were constantly associated with B-cell lymphomas sharing characteristics with WM. Two major differences with WM were the spleen localization of Myd88^{L252P} tumors and increased proliferation. Here, we showed for the first time that IgM lymphoplasmacytic B-cell differentiation is at the heart of Myd88^{L252P} transforming potential. Thus, we also provide an interesting preclinical model for development of new therapeutic approaches or to study immune surveillance for example not only in WM but also in others B-cell lymphomas with features of plasma cell differentiation. Indeed, a better understanding of the underlying molecular mechanisms is necessary in order to develop new therapies for these incurable B-cell cancers.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE138273.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the local IRB of the CHRU of Lille (CSTMT043). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by French national authorization number: 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-2018041009469362 v3.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

COu and LR contributed equally to this work. COu and LR performed and analyzed experiments. AS helped to perform the

repertoire analysis. COB performed and analyzed ELISA. MD and NG performed the transcriptomic experiments. JF, SP, AS and LR performed the bioinformatics analyses. QL and CC performed flow cytometry analysis of bone marrow B-cell subsets. NF participated in the design of the project. KB and ME participated in the development of this study. CV-F created the mouse model, contributed to the experiments and analyzed the results. JF and CV-F directed the study and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The group of JF is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the France Lymphome Espoir association, the Nouvelle Aquitaine Region and the Haute-Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer. CV-F was supported by the France Lymphome Espoir association of patients. SP is supported by the Septentrion committee of Ligue contre le Cancer. ME is supported by an ANR @RAction grant (ANR-14-ACHN-0008), an ANR JCJC

REFERENCES

- Preud'homme JL, Seligmann M. Immunoglobulins on the Surface of Lymphoid Cells in Waldenström's Macroglobulinemia. *J Clin Invest* (1972) 51(3):701–5. doi: 10.1172/JCI106858
- Ghobrial IM. Are You Sure This is Waldenström Macroglobulinemia? *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog* (2012) 2012:586–94. doi: 10.1182/asheducation.V2012.1.586.3798562
- Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. Myd88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* (2012) 367(9):826–33. doi: 10.1056/NEJMoa1200710
- Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, et al. IGHV Gene Features and MYD88 L265P Mutation Separate the Three Marginal Zone Lymphoma Entities and Waldenström Macroglobulinemia/Lymphoplasmacytic Lymphomas. *Leukemia* (2013) 27(1):183–9. doi: 10.1038/leu.2012.257
- Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. Myd88 L265P is a Marker Highly Characteristic of, But Not Restricted to, Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* (2013) 27(8):1722–8. doi: 10.1038/leu.2013.62
- Poulain S, Roumier C, Venet-Caillaud A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* (2016) 22(6):1480–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0646
- Baron M, Simon L, Poulain S, Leblond V. How Recent Advances in Biology of Waldenström's Macroglobulinemia may Affect Therapy Strategy. *Curr Oncol Rep* (2019) 21(3):27. doi: 10.1007/s11912-019-0768-4
- Leblond V, Kastiris E, Advani R, Ansell SM, Buske C, Castillo JJ, et al. Treatment Recommendations From the Eighth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood* (2016) 128(10):1321–8. doi: 10.1182/blood-2016-04-711234
- Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP. Clinical Utility of Recently Identified Diagnostic, Prognostic, and Predictive Molecular Biomarkers in Mature B-cell Neoplasms. *Mod Pathol* (2017) 30(10):1338–66. doi: 10.1038/modpathol.2017.58
- Ruminy P, Etancelin P, Couronné L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, et al. The Isotype of the BCR as a Surrogate for the GCB and ABC Molecular Subtypes in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Leukemia* (2011) 25(4):681–8. doi: 10.1038/leu.2010.302
- Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically Active MYD88 Mutations in Human Lymphoma. *Nature* (2011) 470(7332):115–9. doi: 10.1038/nature09671
- de Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. MYD88 in the Driver's Seat of B-cell Lymphomagenesis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Haematologica* (2019) 104(12):2337–48. doi: 10.3324/haematol.2019.227272
- Jo T, Nishikori M, Kogure Y, Arima H, Sasaki K, Sasaki Y, et al. LUBAC Accelerates B-cell Lymphomagenesis by Conferring Resistance to Genotoxic Stress on B Cells. *Blood* (2020) 136(6):684–97. doi: 10.1182/blood.2019002654
- Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-Cell-Specific Conditional Expression of Myd88p.L252P Leads to the Development of Diffuse Large B-cell Lymphoma in Mice. *Blood* (2016) 127(22):2732–41. doi: 10.1182/blood-2015-11-684183
- Sewastianik T, Guerrero ML, Adler K, Dennis PS, Wright K, Shanmugam V, et al. Human MYD88L265P is Insufficient by Itself to Drive Neoplastic Transformation in Mature Mouse B Cells. *Blood Adv* (2019) 3(21):3360–74. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000588
- Schmidt K, Sack U, Graf R, Winkler W, Popp O, Mertins P, et al. B-Cell-Specific Myd88 L252p Expression Causes a Premalignant Gammopathy Resembling Igm MGUS. *Front Immunol* (2020) 11:602868. doi: 10.3389/fimmu.2020.602868
- Soriano P. Generalized LacZ Expression With the ROSA26 Cre Reporter Strain. *Nat Genet* (1999) 21(1):70–1. doi: 10.1038/5007
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, et al. Targeted Oncogene Activation by Site-Specific Recombination in Transgenic Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89(14):6232–6. doi: 10.1073/pnas.89.14.6232
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, et al. Genomic Deletion of the Whole IgH 3' Regulatory Region (hs3a, hsl2, hs3b, and hs4) Dramatically Affects Class Switch Recombination and Ig Secretion to All Isotypes. *Blood* (2010) 116(11):1895–8. doi: 10.1182/blood-2010-01-264689
- Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B Lymphocyte-Specific, Cre-mediated Mutagenesis in Mice. *Nucleic Acids Res* (1997) 25(6):1317–8. doi: 10.1093/nar/25.6.1317
- Faumont N, Chanut A, Benard A, Cogne N, Delsol G, Feuillard J, et al. Comparative Analysis of Oncogenic Properties and Nuclear Factor-KappaB Activity of Latent Membrane Protein 1 Natural Variants From Hodgkin's Lymphoma's Reed-Sternberg Cells and Normal B-Lymphocytes. *Haematologica* (2009) 94(3):355–63. doi: 10.3324/haematol.13269

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal, histology and cytometry facilities of the BISCEM US 42 INSERM/UMS 2015 CNRS technological platform of the University of Limoges as well as the immunology laboratory of the Limoges University Hospital Center for their technical assistance. We thank Dr Jeanne Cook Moreau (UMR CNRS 7276/INSERM 1276) for careful English editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.641692/full#supplementary-material>

22. Chauzeix J, Laforêt M-P, Deveza M, Crowther L, Marcellaud E, Derouault P, et al. Normal Serum Protein Electrophoresis and Mutated IGHV Genes Detect Very Slowly Evolving Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Cancer Med* (2018) 7(6):2621–8. doi: 10.1002/cam4.1510
23. Almeida JS, Iriabho EE, Gorrepati VL, Wilkinson SR, Grüneberg A, Robbins DE, et al. Imagejs: Personalized, Participated, Pervasive, and Reproducible Image Bioinformatics in the Web Browser. *J Pathol Inform* (2012) 3:25. doi: 10.4103/2153-3539.98813
24. David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, et al. c-Myc Dysregulation is a Co-Transforming Event for Nuclear Factor- κ B Activated B Cells. *Haematologica* (2017) 102(5):883–94. doi: 10.3324/haematol.2016.156281
25. Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, et al. RelA and RelB Cross-Talk and Function in Epstein-Barr Virus Transformed B Cells. *Leukemia* (2014) 28(4):871–9. doi: 10.1038/leu.2013.274
26. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* (2011) 27(21):2957–63. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507
27. Chevrièr S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, et al. CD93 is Required for Maintenance of Antibody Secretion and Persistence of Plasma Cells in the Bone Marrow Niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(10):3895–900. doi: 10.1073/pnas.0809736106
28. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Müller W, et al. Constitutive CD40 Signaling in B Cells Selectively Activates the Noncanonical NF- κ B Pathway and Promotes Lymphomagenesis. *J Exp Med* (2008) 205(6):1317–29. doi: 10.1084/jem.20080238
29. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, Grömminger S, Schuhmacher M, Hölzel M, et al. c-Myc and Rel/NF- κ B are the Two Master Transcriptional Systems Activated in the Latency III Program of Epstein-Barr Virus-Immortalized B Cells. *J Virol* (2009) 83(10):5014–27. doi: 10.1128/JVI.02264-08
30. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N, Vos JM, Liu X, et al. Transcriptome Sequencing Reveals a Profile That Corresponds to Genomic Variants in Waldenström Macroglobulinemia. *Blood* (2016) 128(6):827–38. doi: 10.1182/blood-2016-03-708263
31. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A Gene Expression-Based Method to Diagnose Clinically Distinct Subgroups of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(17):9991–6. doi: 10.1073/pnas.1732008100
32. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM, et al. Genomic Analysis of Hairy Cell Leukemia Identifies Novel Recurrent Genetic Alterations. *Blood* (2017) 130(14):1644–8. doi: 10.1182/blood-2017-01-765107
33. Harroch S, Gothelf Y, Revel M, Chebath J. 5' Upstream Sequences of MyD88, an IL-6 Primary Response Gene in M1 Cells: Detection of Functional IRF-1 and Stat Factors Binding Sites. *Nucleic Acids Res* (1995) 23(17):3539–46. doi: 10.1093/nar/23.17.3539
34. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF- κ B Activation by Alternative Splicing of Myd88. *Curr Biol* (2002) 12(6):467–71. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00712-1
35. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon J-M. Up-Regulation of MyD88s and SIGIRR, Molecules Inhibiting Toll-like Receptor Signaling, in Monocytes From Septic Patients. *Crit Care Med* (2006) 34(9):2377–85. doi: 10.1097/01.CCM.0000233875.93866.88
36. Lee FF-Y, Davidson K, Harris C, McClendon J, Janssen WJ, Alper S. NF- κ B mediates lipopolysaccharide-induced alternative pre-mRNA splicing of MyD88 in mouse macrophages. *J Biol Chem* (2020) 295(18):6236–48. doi: 10.1074/jbc.RA119.011495
37. Meng R, Li D, Feng Z, Xu Q. MyD88 Hypermethylation Mediated by DNMT1 is Associated With LTA-induced Inflammatory Response in Human Odontoblast-Like Cells. *Cell Tissue Res* (2019) 376(3):413–23. doi: 10.1007/s00441-019-02993-0
38. Šutić M, Motzek A, Bubanović G, Linke M, Sabol I, Vugrek O, et al. Promoter Methylation Status of ASC/TMS1/PYCARD is Associated With Decreased Overall Survival and TNM Status in Patients With Early Stage non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res* (2019) 8(6):1000–15. doi: 10.21037/tlcr.2019.12.08
39. Wang W, Zhao Z, Wu F, Wang H, Wang J, Lan Q, et al. Bioinformatic Analysis of Gene Expression and Methylation Regulation in Glioblastoma. *J Neurooncol* (2018) 136(3):495–503. doi: 10.1007/s11060-017-2688-1
40. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the Recurrent MYD88(L265P) Somatic Mutation for B Cell Tolerance. *J Exp Med* (2014) 211(3):413–26. doi: 10.1084/jem.20131424
41. Komori T. Mouse Models for the Evaluation of Osteocyte Functions. *J Bone Metab* (2014) 21(1):55–60. doi: 10.11005/jbm.2014.21.1.55
42. Schmidt-Suppran M, Rajewsky K. Vagaries of Conditional Gene Targeting. *Nat Immunol* (2007) 8(7):665–8. doi: 10.1038/nio707-665
43. Pillai S, Cariappa A. The Follicular Versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision. *Nat Rev Immunol* (2009) 9(11):767–77. doi: 10.1038/nri2656
44. Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, et al. Germinal Center B Cell Maintenance and Differentiation are Controlled by Distinct NF- κ B Transcription Factor Subunits. *J Exp Med* (2014) 211(10):2103–18. doi: 10.1084/jem.20132613
45. Merzianu M, Jiang L, Lin P, Wang X, Weber DM, Vadhan-Raj S, et al. Nuclear BCL-10 Expression is Common in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia and Does Not Correlate With P65 NF- κ B Activation. *Mod Pathol* (2006) 19(7):891–8. doi: 10.1038/modpathol.3800609
46. Okabe S, Fukuda S, Kim Y-J, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, et al. Stromal Cell-Derived factor-1 α /CXCL12-induced Chemotaxis of T Cells Involves Activation of the RasGAP-associated Docking Protein p62Dok-1. *Blood* (2005) 105(2):474–80. doi: 10.1182/blood-2004-03-0843
47. Perrot A, Corre J, Avet-Loiseau H. Risk Stratification and Targets in Multiple Myeloma: From Genomics to the Bedside. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* (2018) 38:675–80. doi: 10.1200/EDBK_200879
48. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Corrigendum: Long-lived Antigen-Induced IgM Plasma Cells Demonstrate Somatic Mutations and Contribute to Long-Term Protection. *Nat Commun* (2016) 7:12687. doi: 10.1038/ncomms12687
49. Li Z, Wang H, Xue L, Shin D-M, Roopenian D, Xu W, et al. Emu-BCL10 Mice Exhibit Constitutive Activation of Both Canonical and Noncanonical NF- κ B Pathways Generating Marginal Zone (MZ) B-cell Expansion as a Precursor to Splenic MZ Lymphoma. *Blood* (2009) 114(19):4158–68. doi: 10.1182/blood-2008-12-192583
50. Moore CR, Liu Y, Shao C, Covey LR, Morse HC, Xie P. Specific Deletion of TRAF3 in B Lymphocytes Leads to B-lymphoma Development in Mice. *Leukemia* (2012) 26(5):1122–7. doi: 10.1038/leu.2011.309
51. Vincent-Fabert C, Saintamand A, David A, Alizadeh M, Boyer F, Arnaud N, et al. Reproducing Indolent B-cell Lymphoma Transformation With T-cell Immunosuppression in LMP1/CD40-expressing Mice. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(4):412–4. doi: 10.1038/s41423-018-0197-6
52. Vincent-Fabert C, Roland L, Zimber-Strobl U, Feuillard J, Faumont N. Pre-Clinical Blocking of PD-L1 Molecule, Which Expression is Down Regulated by NF- κ B, JAK1/JAK2 and BTK Inhibitors, Induces Regression of Activated B-cell Lymphoma. *Cell Commun Signal* (2019) 17(1):89. doi: 10.1186/s12964-019-0391-x
53. Vincent-Fabert C, Soubeyran I, Velasco V, Parrens M, Jeannot R, Lereclus E, et al. Inflamed Phenotype of Splenic Marginal Zone B-cell Lymphomas With Expression of PD-L1 by Intratumoral Monocytes/Macrophages and Dendritic Cells. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(6):621–4. doi: 10.1038/s41423-019-0228-y
54. Reimann M, Schrezenmeier JF, Richter-Pechanska P, Dolnik A, Hick TP, Schleich K, et al. Adaptive T-cell Immunity Controls Senescence-Prone MyD88- or CARD11-mutant B-Cell Lymphomas. *Blood* (2020). doi: 10.1182/blood.2020005244
55. Jalali S, Price-Troska T, Paludo J, Villasboas J, Kim H-J, Yang Z-Z, et al. Soluble PD-1 Ligands Regulate T-cell Function in Waldenström Macroglobulinemia. *Blood Adv* (2018) 2(15):1985–97. doi: 10.1182/bloodadvances.2018021113

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ouk, Roland, Gachard, Poulain, Oblet, Rizzo, Saintamand, Lemasson, Carrion, Thomas, Balabanian, Espéli, Parrens, Soubeyran, Boulin, Faumont, Feuillard and Vincent-Fabert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7.2. Étude de l'expression de la mutation humaine MYD88 L265P dans un modèle *in vitro* original.

En parallèle de la création d'un modèle murin d'expression de la mutation MYD88 L252P, j'ai mis au point un nouveau modèle cellulaire pour étudier l'impact de l'expression de la mutation humaine L265P dans la lignée cellulaire humaine EREB2.5.

Ce projet est basé sur une précédente étude du laboratoire où nous avons étudié le devenir phénotypique et fonctionnel des cellules B proliférantes infectées par le virus d'Epstein Barr (EBV). L'EBV a été découvert dans la forme « africaine » (également connue sous le nom « endémique » à forte incidence) du lymphome de Burkitt (BL). Ses pouvoirs oncogéniques ont été confirmés par sa capacité à transformer des cellules B au repos *in vitro* [291]. Cependant bien qu'il ait été démontré qu'il infecte de manière asymptomatique la plupart de la population adulte mondiale, l'EBV réussit à rester silencieux dans le compartiment B mémoire, démontrant la capacité de ces cellules B infectées à échapper au système immunitaire de l'hôte. Les résultats de cette précédente étude montre que les cellules infectées par l'EBV et en latence III (correspondant à la phase de prolifération) présentent un phénotype de cellules B régulatrices (Breg), caractérisé par l'expression de niveaux élevés de CD24 et CD38 ainsi que de la molécule immunorégulatrice CD274/PD-L1 [291]. De plus elles sécrètent des niveaux élevés de trois cytokines immunosuppressives caractéristiques des Breg : IL-10, IL-35 et TGF- β 1. La co-culture de cellules B de latence III de l'EBV avec leurs cellules T autologues pré-activées par CD2, CD3 et CD28 a conduit à la répression de la prolifération des cellules T et à l'expansion des cellules T régulatrices (Treg) CD4^{pos} FoxP3^{High} à partir de cellules T autologues quiescentes. La co-incubation avec des anticorps contre PD-L1 a montré que cette expansion de Treg était dépendante de l'axe PD-1/PD-L1.

Dans ce contexte, l'activation constitutive de MYD88 via sa mutation L265P étant connue pour jouer un rôle intrinsèque dans la signalisation continue de la voie NF- κ B, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules B mutées pouvaient avoir un potentiel à devenir des cellules Breg [176]. Nous avons alors développé un modèle cellulaire pour étudier l'implication de la mutation MYD88 dans la signalisation NF- κ B ainsi que dans l'inflammation et la transformation cellulaire.

7.2.1. Matériel utilisé pour l'étude

7.2.1.1. Lignée cellulaire humaine EREB2.5

Le modèle cellulaire choisi pour cette étude est une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines (LCL). Les cellules EREB2.5 sont des lymphocytes B issus de sang de cordon ombilical immortalisés après infection par la souche du virus Epstein-Barr (EBV) déficiente en *EBNA-2* appelée P3HR1. Au sein de la souche, P3HR1 est complété par un vecteur de type mini RBV permettant l'expression d'une protéine de fusion EBNA2-Estrogen Receptor. L'ajout d'œstradiol, analogue de l'œstrogène, provoque la translocation dans le noyau de EBNA2-ER. EBNA2-ER restaure alors la latence virale de type III. La protéine LMP1 de l'EBV est exprimée en présence d'œstradiol et induit l'activation de la voie NF- κ B et par conséquent la prolifération cellulaire. Le programme de prolifération associé à la latence III peut être ainsi réversiblement induit ou réprimé par l'ajout ou le retrait d'œstradiol (1 μ M) dans le milieu de culture [292] (cf. **Figure 32**).

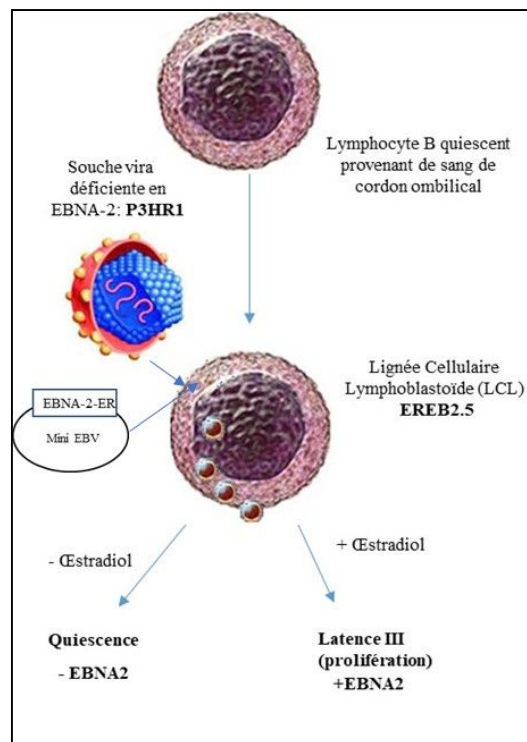


Figure 32 : Représentation schématique de l'obtention de la lignée EREB2.5

Les cellules EREB2.5 en absence d'œstradiol sont bloquées en quiescence (E0) et inversement en présence d'œstradiol elles activent le programme de la latence III de EBV.

7.2.1.2. Vecteur épisomique inducible

Les vecteurs utilisés dans cette étude sont des vecteurs épisomiques inducibles développés en 2005 par Jean Feuillard sous la direction du professeur Pr Georg W. Bornkamm [293][294]. Le système d'induction de ce vecteur est de type « Tet-On », c'est-à-dire que l'expression des protéines d'intérêt est induite en présence de tétracycline [295]. Ce vecteur possède différentes propriétés (cf. **Figure 33**) :

1. Il possède une résistance à l'hygromycine (Hygro) permettant la sélection des cellules contenant ce vecteur.
2. Il se maintient dans la cellule sous forme épisomique grâce à l'expression constitutive de la protéine EBNA-1 qui se fixe à l'origine de réplication dérivée de l'EBV, EBV-OriP, présente dans ce vecteur.
3. Il est composé d'un promoteur pCMV-TetO7 inducible à la doxycycline et permettant l'expression bidirectionnelle du gène NGFRt qui code une forme tronquée du récepteur NGFR et le gène d'intérêt à étudier. Dans notre cas, le gène correspond à celui de la *LUCIFERASE* (Luc, vecteur contrôle) ou à celui de *MYD88* sauvage (MYD88 WT) ou à celle de *MYD88* muté (MYD88 L265P). Concernant la protéine NGFRt, une fois exprimée, elle est localisée à la membrane plasmique mais elle est dépourvue de signalisation du fait de l'absence de sa partie cytoplasmique. L'intérêt de ce marqueur d'induction est de pouvoir sélectionner les cellules induites, exprimant donc le NGFRt, soit par tri magnétique, soit par cytométrie en flux.
4. Il est inducible par la doxycycline, analogue de la tétracycline (Tet). La doxycycline se fixe au transactivateur rtTA (reverse tetracyclin TransActivator), augmentant ainsi l'affinité de rtTA pour l'opéron TetO du promoteur bidirectionnel (Bi Tet O7). Le promoteur bidirectionnel permet la transcription simultanée d'un marqueur d'induction (NGFRt) et de notre protéine d'intérêt LUCIFERASE ou MYD88 WT ou L265P selon les conditions.

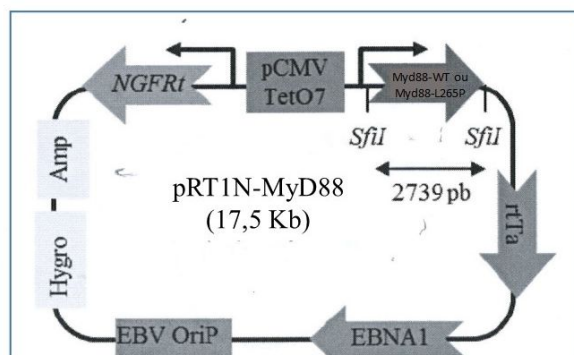


Figure 33 : Schéma du vecteur d'expression Prt1-*MYD88* WT ou L265P

Le vecteur plasmidique pRT1 est composé d'un promoteur pCMV-TetO7 inducible par la doxycycline et permettant l'expression bidirectionnelle du gène marqueur NGFRt et du gène *MYD88* sauvage ou muté. Il possède un gène de résistance à l'hygromycine (Hygro).

7.2.2. Résultats non publiés

L'intérêt de la lignée EREB2.5 est de pouvoir éteindre le programme de latence III de l'EBV et donc d'arrêter la prolifération cellulaire et l'activation de la voie NF- κ B en privant les cellules d'œstradiol (le virus se trouve en latence 0 avec absence d'expression de LMP1) ce qui induit une entrée en quiescence des cellules (cf. **Figure 32**). Il devient alors possible d'étudier spécifiquement l'effet de l'expression de la mutation MYD88 L265P sur les voies de signalisation situées en aval notamment la voie NF- κ B (cf. **Figure 34**).

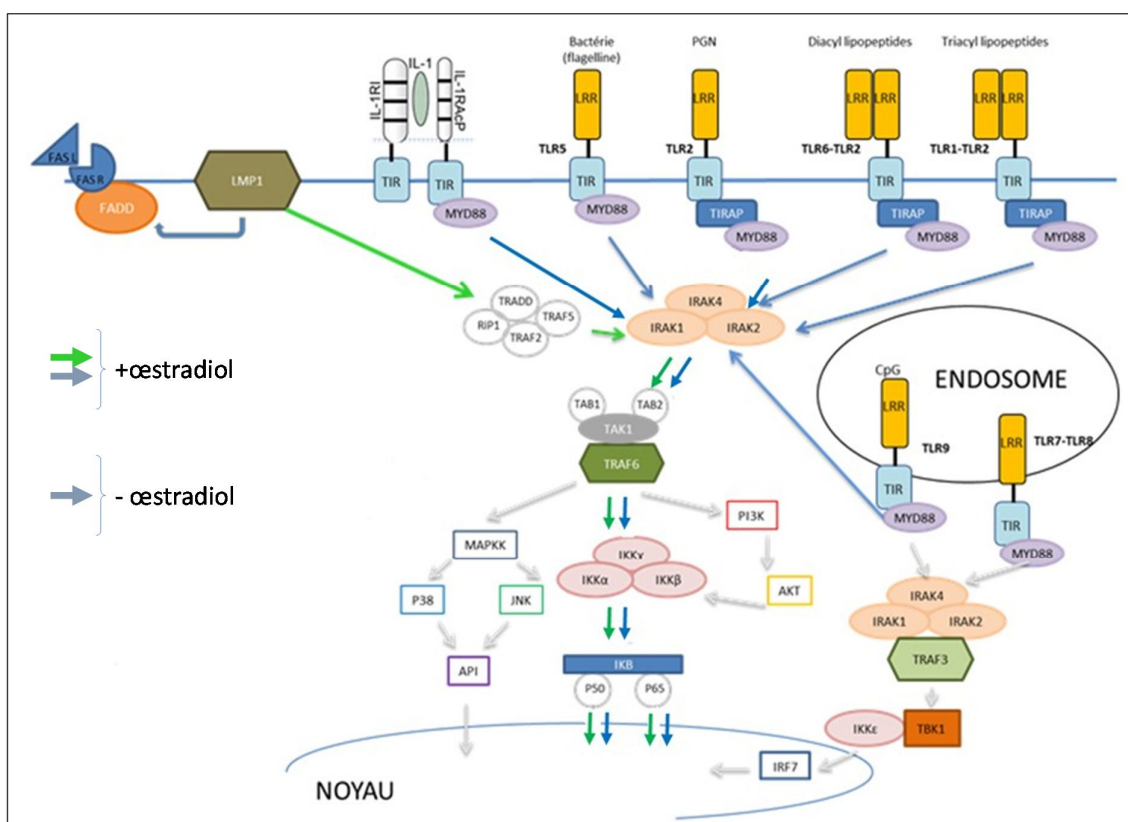


Figure 34 : Représentation schématique de l'activation de la voie NF- κ B en présence ou en absence d'œstradiol.

La protéine LMP1 de l'EBV est exprimée en présence d'œstradiol et induit l'activation de la voie NF- κ B. Le programme de prolifération associé à la latence III peut être ainsi réversiblement induit ou réprimé par l'ajout ou le retrait d'œstradiol. Ce système permet d'étudier la voie *MYD88* indépendamment de LMP1.

7.2.2.1. Validation du modèle cellulaire

7.2.2.1.1. Vérification de la lignée cellulaire EREB2.5

Comme évoqué plus haut, les EREB2.5 sont des cellules B humaines immortalisées par l'EBV dont la prolifération est dépendante de l'œstradiol. En présence d'œstradiol la protéine LMP1 de l'EBV active de la voie NF- κ B (phase de prolifération, latence III). En privant les cellules en œstradiol, le virus se trouve en latence 0 (absence d'expression de LMP1) et les cellules rentrent en quiescence. Afin de vérifier le bon mécanisme d'induction des cellules, elles sont cultivées pendant 3 jours avec et sans œstradiol. Un western blot est ensuite effectué pour mettre en évidence dans nos différentes conditions (lignée PRI témoin positif, lignée EREB non privée/ privé) la quantité de protéine TRAF1 produite, *TRAF1* étant un gène cible de la voie NF- κ B (cf. **Figure 35**).

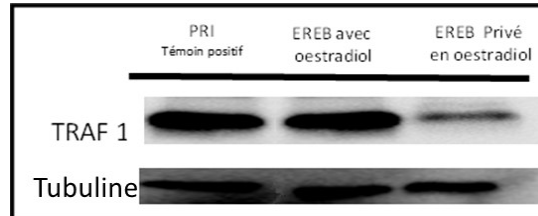


Figure 35 : Vérification de la potentialité de privation des EREB 2.5

Afin de vérifier le bon mécanisme d'induction des EREB2.5, les cellules sont cultivées pendant 3 jours sans œstradiol. On utilise un témoin positif qui exprime TRAF1, la lignée PRI. Ainsi par comparaison, on constate qu'il y a une production conséquente de TRAF1 dans la ligne PRI et les EREB2.5 + œstradiol, ce qui n'est pas retrouvé en absence œstradiol dans les EREB2.5 privées d'œstradiol.

Comme le montre la figure 33, en présence d'œstradiol, la protéine TRAF1 est produite en grande quantité dans la lignée EREB2.5 comme dans la lignée lymphoblastoïde en latence III PRI (contrôle) alors qu'en absence d'œstradiol, elle n'est quasiment plus produite par les cellules EREB2.5. Ces résultats permettent alors de vérifier que le mécanisme d'induction est intact dans ce type cellulaire et, par conséquent que le matériel initial est fiable. L'intérêt de cette lignée réside dans le fait qu'il est possible à tout moment d'éteindre la voie de NF- κ B en les privant d'œstradiol. Il devient ainsi possible d'étudier spécifiquement l'effet, dans notre cas, de l'expression de la mutation MYD88 L265P sur cette voie de signalisation dans des cellules quasi quiescentes.

7.2.2.1.2. Validation des différentes constructions dans la lignée cellulaire EREB2.5

Pour cette étude, 3 vecteurs PRT1^{LUC}, PRT1 MYD88^{WT}, PRT1 MYD88^{L265P} ont été utilisés. La construction PRT1^{LUC} permet d'avoir un contrôle sur l'impact de la transfection, tandis que la construction PRT1 MYD88^{WT} sera le témoin négatif et permettra de comparer l'impact de l'expression de la protéine normale sans activation par rapport à la version mutée constitutivement active. Il devient ainsi possible de s'assurer que les effets engendrés sont liés spécifiquement à l'activité de MYD88 et non à l'augmentation de l'expression de MYD88. En plus du cDNA d'intérêt, ce vecteur contient la séquence du gène codant pour la protéine NGFR tronquée (NGFRt) qui permet d'identifier et sélectionner les cellules transfectées. Afin de vérifier le bon mécanisme d'induction des EREB2.5 transfectées, les cellules sont privées 3 jours en œstradiol et induit à la doxycycline pendant 48h, puis triées NGFR positive. On utilise un témoin positif qui exprime LMP1 (lignée PRI). Ainsi par comparaison, on constate qu'il y a une expression conséquente sur le témoin positif. Cette expression n'est pas retrouvée dans les EREB privées transfectées avec les vecteurs PRT1^{LUC}, PRT1 MYD88^{WT}, PRT1 MYD88^{L265P} (cf. **Figure 36**).

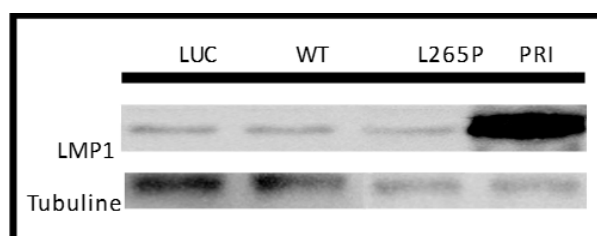


Figure 36 : Vérification de l'efficacité et potentialité de privation des EREB 2.5 transfectées.

Afin de vérifier le bon mécanisme d'induction des EREB2.5 transfectées les cellules sont privées 3 jours en œstradiol et induit à la doxycycline pendant 48h puis triées. On utilise un témoin positif (lignée PRI) qui exprime LMP1. Ainsi par comparaison on constate qu'il y a une expression conséquente sur le témoin positif. Cette expression n'est pas retrouvée dans les EREB privés transfectées.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'étudier précisément l'impact d'une surexpression de la mutation MYD88 L265P sur la voie NF-κB et les gènes cibles de cette voie de signalisation.

Enfin, pour valider le modèle cellulaire, une RT-qPCR est réalisée afin de quantifier la production d'ARN de MYD88. Les expressions de *MYD88* et de *HPRT1* (« gène de ménage ») ont été quantifiées. Les cellules EREB2.5 transfectées LUC ont été choisies comme référence. Pour chaque échantillon, le ΔCT (= moyenne CT (*MYD88*)-moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta CT$ (= $\Delta\Delta CT$ (*MYD88*) de l'échantillon- ΔCT Luc), et enfin l'expression relative (= $2^{-\Delta\Delta CT}$) ont été calculés. Les barres d'erreur représentent les écart-types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques obtenus à partir du test de Student ont, comme attendu, confirmé que la transcription de *MYD88* est plus importante dans les cellules transfectées *MYD88*^{WT} et *MYD88*^{L265P} par rapport au contrôle *MYD88*^{LUC}. On remarque également que la transcription de *MYD88* est plus importante dans la condition *MYD88*^{L265P} par rapport à la condition *MYD88*^{WT} (cf. **Figure 37**). Ces résultats ont aussi été confirmés au niveau protéique par Western Blot (cf. **Figure 38**).

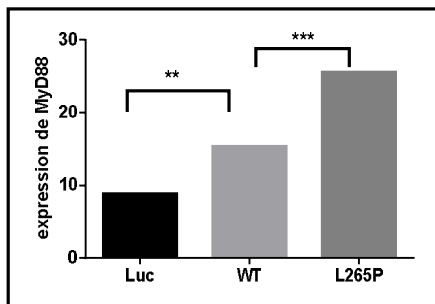


Figure 37 : Étude du profil d'expression de *MYD88* par qPCR après privation en œstradiol et activation à la doxycycline.

Les EREB2.5 ont été privées 3 jours, activées 48 h à la doxycycline et triées NGFR positives. En présence de la mutation *MYD88* L265P et en absence de LMP1 grâce à la privation on observe une augmentation de l'expression des ARNm *MYD88*. Cette expression nous permet de valider l'efficacité de nos constructions. * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

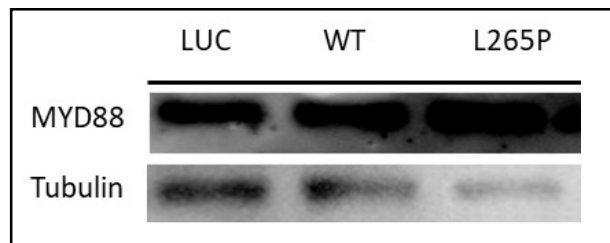


Figure 38 : Vérification de l'expression de *MYD88* dans les EREB 2.5 transfectées.

Afin de vérifier le bon mécanisme d'induction des EREB2.5 transfectées les cellules sont privées 3 jours en œstradiol et induit à la doxycycline pendant 48h puis triées. Ainsi par comparaison entre les différentes conditions de transfection on constate qu'il y a une expression conséquente de la protéine *MYD88* dans le EREB L265P.

Ceci permet de valider le modèle cellulaire exprimant *MYD88*.

7.2.2.2. Etude de l'impact de l'expression de MYD88 L265P sur

la voie NF- κ B

Une nouvelle analyse en qRT-PCR a été réalisée afin de mesurer le niveau de transcription des gènes exprimant les protéines A20 et TRAF1, gènes cibles de la voie NF- κ B. Pour cette étude les EREB2.5 ont été privées en œstradiol pendant 3 jours, activées 48 h à la doxycycline et triées NGFR positives. Les expressions de *A20* et *TRAF1* a été normalisées par rapport au gène de ménage *HPRT1*. En présence de la mutation MYD88^{L265P} et en absence de LMP1, on observe une augmentation de l'expression des ARNm *A20* (A) et *TRAF1* (B) qui indique une activation constitutive de NF- κ B. Cette analyse confirme que la protéine MYD88^{L265P} active constitutivement la voie NF- κ B (cf. **Figure 39**).

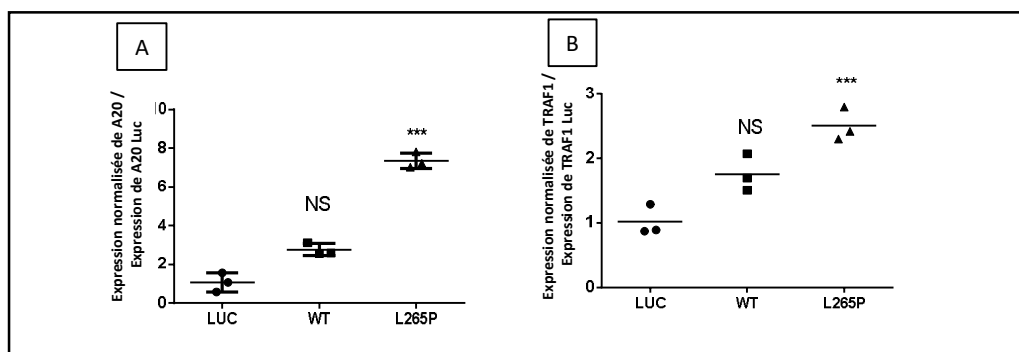


Figure 39 : Étude du profil d'expression de *A20* et *TRAF1* après privation et activation à la doxycycline

Les EREB ont été privées en œstradiol 3 jours, induites 48 h à la doxycycline et triées NGFR positives. En présence de la mutation *MYD88* L265P et en absence de LMP1 on observe une augmentation de l'expression des ARNm *A20* (A) et *TRAF1* (B) gènes cibles de la voie NF- κ B. * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

7.2.2.3. Transcriptome EREB à comparer avec les patients

Afin d'identifier une signature moléculaire propre à la mutation MYD88 L265P une analyse transcriptomique sur une puce Affymetrix a été réalisée sur des cellules EREB transfectées privées, induites à la doxycycline (conditions PRT1^{LUC}, PRT1 MYD88^{WT}, PRT1 MYD88^{L265P}) et triées sur la base de l'expression du NGFRt. En parallèle, une partie de ces cellules a été cultivée avec des oligo désoxynucléotides CpG- synthétiques modifiés au phosphorothiolate (+CpG-ODN) pour activer la signalisation TLR9 (cf. **Figure 40**).

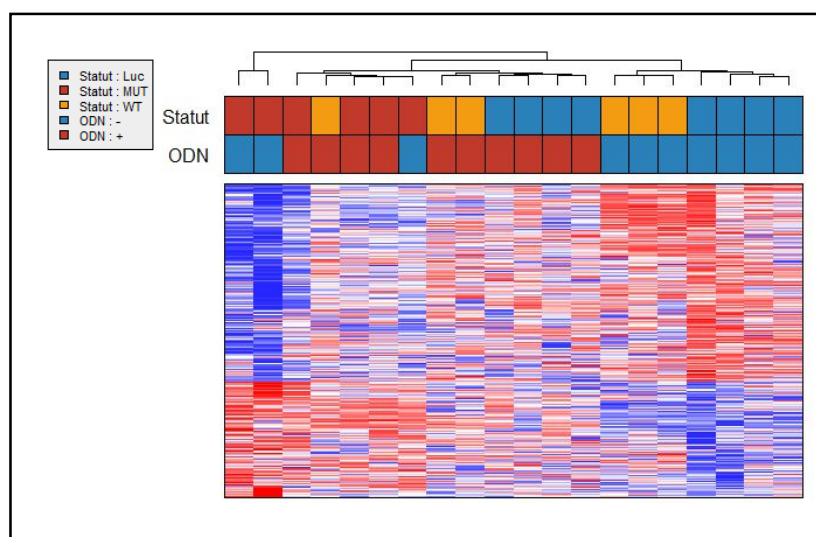


Figure 40 : Analyse transcriptomique des EREB exprimant la mutation **MYD88 L265P**

Les EREB2.5 PRT1^{LUC}, PRT1 MYD88^{WT}, PRT1 MYD88^{L265P} ont été privées trois jours en œstradiol et cultivées avec (+CpG) et sans CpG (-CpG). Ces cellules NGFR+ sont ensuite triées à l'aide d'un ARIA III (trieur cellulaire) afin de réaliser une étude transcriptomique.

Une première analyse transcriptomique a été réalisée afin d'identifier les gènes dérégulés dans la condition EREB MYD88L265P par rapport au contrôle EREB Luc. Cette analyse permet de regrouper les différents échantillons selon le statut MYD88. En effet dans la branche de droite on ne retrouve que les échantillon EREB LUC ou EREB MYD88 WT (sans signalisation TLR activée). Dans la partie du milieu, on retrouve les EREB LUC ou MYD88 WT stimulées par le CpG et dans la branche de gauche sont clusterisés les échantillons possédant la mutation MYD88 L265P +/- CpG. Parmi les gènes dérégulés (fold change >1.5) on retrouve des gènes de la signature NF-κB (*TNFAIP3*, *EBI3* et *FAS* notamment), un regroupement des gènes anti-apoptotique (*BCL2A1*, *MCL1*), un regroupement des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (*CCNL2* et *CCND2* notamment), ainsi que l'expression du gène *CD274* (classiquement nommé PDL-1) impliqué dans la réponse immunosuppressive.

L'étude de cette puce montre que l'activation constitutive de *MYD88* est clairement associée à une signature NF- κ B ainsi qu'à la protection contre l'apoptose, la prolifération cellulaire et un effet immunosuppresseur à l'origine de l'échappement immunitaire (cf. **Figure 41**).

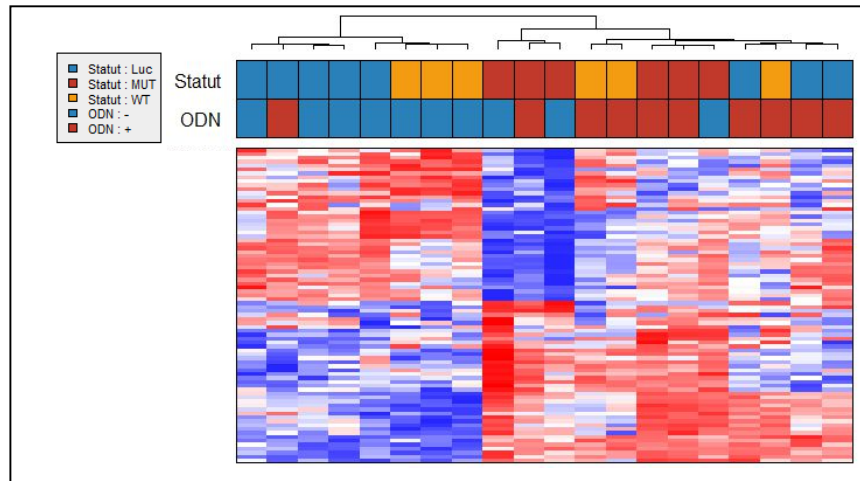


Figure 41 : Mise en évidence d'une signature immune liée à l'expression de la mutation *MYD88* L265P dans les EREB. Les EREB2.5 PRT1^{LUC}, PRT1 *MYD88*^{WT}, PRT1 *MYD88*^{L265P} ont été privées trois jours en œstradiol et cultivées avec (+CpG) et sans CpG (-CpG). Ces cellules NGFR+ sont ensuite triées à l'aide d'un ARIA III (trieur cellulaire) afin de réaliser une étude transcriptomique.

Pour compléter cette analyse transcriptomique nous avons comparé cette première signature à celle de Camille Laurent <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1026530>. sur la surveillance immune. Les gènes sélectionnés pour étudier la réponse immune sont : *ARG1, BTLA, C10ORF54, CCL2, CCL22, CD163, CD1D, CD24, CD25, CD27, CD274, CD38, CD39, CD80, CD86, COL17A1, CSF1, CTLA4, EB13, ENTPD1, FOXP3, GDF15, GZMB, HAVCR2, HGF, ICOS, IDO1, IDO2, IFNG, IL10, IL12, IL13, IL2, IL23, IL4, IL6, IL6ST, JAK2, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, LAG3, LAIR1, LGALS1, LGALS3, MCL1, MRC1, MSRI, MYC, NT5E, PCD1, PDCD1, PDCD1LG2, PDCD1LG2, PIMI, PTGS1, PTGS2, PVR, SOCS3, STAT3, STAT5, TGFB1, TIGIT, TIMP1, TNFA, TNFRSF14, VEGFA et VTCN1*.

Une nouvelle fois, les échantillons EREB *MYD88* L265P +/- CpG et les LUC ou *MYD88* + CpG se regroupent. Les gènes différentiels dont l'expression est augmentée sont : *MCL1, CSF1, CCL22, CD274 (PD-L1), CD163, PDCD1LG2 (PD-L2), EB13, IL6, JAK2, PTGS1, CD80, IL6ST et ENTPD1*. Par rapport au hasard, la signature *MYD88* dans les EREB est enrichie d'un facteur 2.5 en gène de la réponse immune (Test de Fisher, $p < 10^{-6}$)

7.2.2.4. Immunophénotypage B des EREB 2.5 exprimant la mutation *MYD88* L265P

MYD88 est une protéine adaptatrice, se situant à l'interface entre l'inflammation et la transformation cellulaire. Un certain nombre de cytokines (IL-6, IL-35 et IL-10), mais également des facteurs de croissance plus ubiquitaires jouent un rôle essentiel dans le déclenchement et l'amplification de la réponse inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires) et dans sa régulation négative (cytokines anti-inflammatoires). Parmi les cellules qui peuvent influencer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires on retrouve les B régulateurs (Bregs).

La fonction régulatrice des Bregs est associée à la présence et à l'activation de récepteurs comme CD40 et le BCR [296]. Chez les Bregs de multiples sous-ensembles avec des caractéristiques distinctes et partiellement chevauchantes ont été identifiés chez l'homme. Parmi eux, on retrouve. Les Breg immatures, définis comme étant CD19⁺, CD24^{High}, CD38^{High} et PDL-1^{High} [297], les Breg B10, décrits comme étant CD19⁺ CD24^{High} CD27⁺ et dans 60% des cas CD38⁺ [298] et les Breg plasmocytaires, d'après Franquesa *et al.*, décrits comme étant CD19⁺ CD27^{High} CD38^{High} [298].

Nous avons alors analysé la signature Breg immunophénotypique de MYD88 par cytométrie en flux.

Dans notre modèle *in vitro*, les EREB2.5 privées 3 jours, activées 24h à la doxycycline sont marquées avec du CD25-PE, CD27-PE, CD1d-PE, PDL1-PE, CD24APC, CD38 PECy5.5. L'analyse a été faite sur les cellules NGFR positives. L'histogramme de la figure 38 correspond à la moyenne de fluorescence de chaque anticorps rapporté à la moyenne de fluorescence de l'isotype contrôle correspondant (*cf. Figure 42*). Les résultats obtenus suggèrent qu'en présence de la mutation L265P de *MYD88* nous avons une augmentation de l'expression des marqueurs CD25, CD27, CD1d, PDL1, CD38 et d'une moindre mesure CD24. Cette augmentation d'expression est corrélée avec le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs CD25, CD27, PDL1, CD24 et CD38 même si pour ce dernier ce phénomène est moins marqué. Concernant CD1d l'augmentation de la moyenne de fluorescence n'est pas corrélée à l'augmentation du pourcentage de cellules marquées.

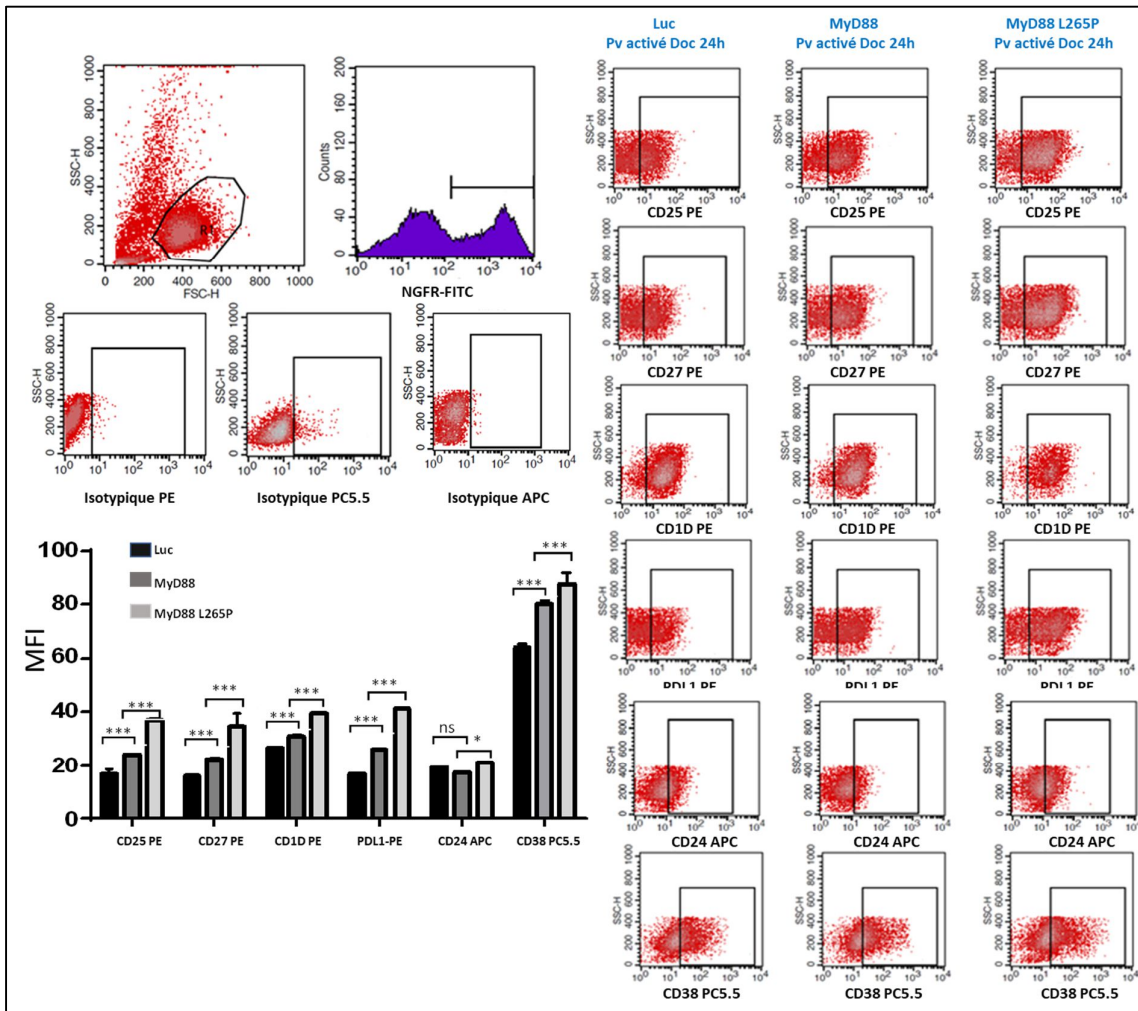


Figure 42 : Mise en évidence de l'effet de la mutation MYD88 sur le profil B régulateur des EREB2.5.

Les EREB2.5 privées 3 jours, activées 24h à la doxycycline sont marquées avec du CD25-PE, CD27-PE, CD1d-PE, PDL1-PE, CD24APC, CD38 PECy5.5. Les histogrammes correspondent à la moyenne de fluorescence de chaque anticorps rapporté à la moyenne de fluorescence de chaque isotype contrôle. L'expression de MYD88 L265P induit l'augmentation de l'expression de l'ensemble des marqueurs ainsi que du pourcentage de cellules, même si cela est moins marqué pour le CD24. * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

D'après les résultats ci-contre, un profil de B régulateur se dessinerait en présence de la mutation *MYD88* L265P puisque l'on observe une augmentation de l'expression et du nombre de cellules exprimant PDL1, CD27, CD24 et CD38. Ceci reste à confirmer avec l'étude de l'expression des interleukines. En effet pour qu'un lymphocyte B soit considéré comme un Breg il doit de prime abord posséder un profil d'expression PDL1 et IL10 augmenté.

7.2.2.5. Etude de l'effet de la mutation L265P sur le niveau d'expression des interleukines IL10-TGFβ-IL35.

Les propriétés des Bregs sont fortement liées à la sécrétion anti-inflammatoire et immunosuppressive des interleukines IL-10, IL-35 et TGF-β1. Lors de cette étude les EREB2.5 ont été privées 3 jours, activées 48 h à la doxycycline et triées NGFR positives. L'expression de l'ARNm des deux sous-unités de *IL35* (*EBI3* et *IL12*), *IL10*, *TGFβ* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Les cellules EREB2.5 transfectées LUC ont été choisies comme référence.

En présence de la mutation *MYD88* L265P lorsque les cellules sont privées, on observe une augmentation de l'expression de l'interleukine IL35 et une diminution de l'expression des interleukines TGFβ. En ce qui concerne IL10, il n'y a pas de différence significative entre les EREB Luc, *MYD88* WT et *MYD88* L265P (cf. **Figure 43**).

L'augmentation de l'expression de l'interleukine IL35 traduit une augmentation de l'activité immunosuppressive dans les EREB *MYD88* mutées (L265P), mais en revanche le niveau d'expression d'IL10 ne diffère pas.

Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans notre modèle EREB *MYD88* L265P, la fonction régulatrice des LB est déficiente du fait de la faible production d'IL10 mais qu'elle peut être au cœur de l'échappement immunitaire comme chez les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé où la population de LB est décrite comme étant CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} avec une sécrétion plus faible d'IL-10 [299].

En effet, comme le décrit l'équipe de Lemoine et al. les LB CD19⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} CD5⁺ peuvent inhiber la prolifération des LT, indépendamment de la production d'IL-10 [300].

Par conséquent, il semblerait que la mutation *MYD88* participe à l'augmentation de l'activité immunosuppressive comme précédemment trouvé lors de l'étude transcriptomique.

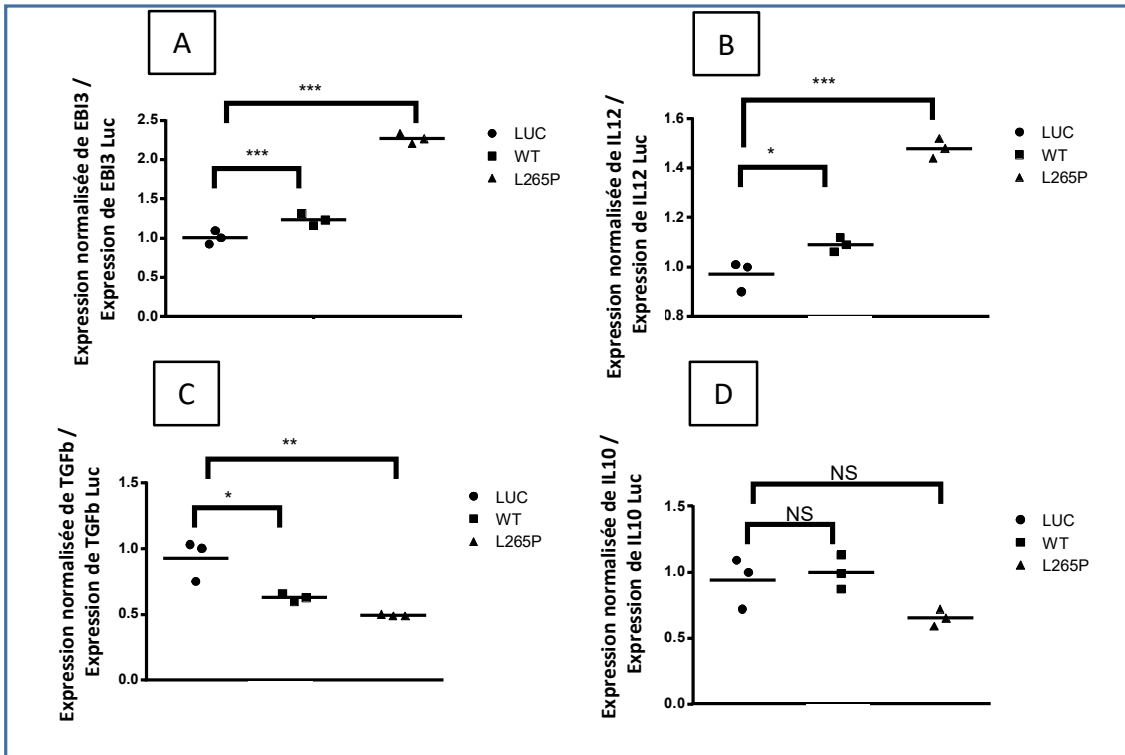


Figure 43 : Étude de l'effet de la mutation L265P sur le niveau d'expression des interleukines IL10-TGFβ-IL35.

Les EREB ont été privées 3 jours en œstradiol, induites 48 h à la doxycycline et triées NGFR positives. En présence de la mutation MYD88 L265P lorsque les cellules sont privées on observe une augmentation de l'expression de l'interleukine IL35 (A et B) et une diminution de l'expression des interleukines TGFβ et IL10 (C et D). L'augmentation de l'expression de l'interleukine IL35 traduit une augmentation de l'activité immunosuppressive dans les EREB *MYD88* mutées (L265P). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

Nos résultats fournissent des indices mécanistiques sur les raisons pour lesquelles les cellules B exprimant *MYD88* L265P échappe à la surveillance immune. Grâce à une étude transcriptomique, nous montrons que l'activation constitutive de *MYD88* est clairement associée à une signature NF-κB ainsi qu'à la protection contre l'apoptose, la prolifération cellulaire et un effet immunosuppresseur à l'origine de l'échappement immunitaire. Nous montrons également que ces cellules ont un profil de cellules Breg, avec l'expression de CD27, CD24, CD38 et CD274/PD-L1 et la sécrétion de niveaux élevés des cytokines immunosuppressives IL-35.

La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules B dans notre modèle murin est en cours avec notamment l'étude de leur pouvoir inhibiteur sur l'activation des lymphocytes T. Une telle étude chez l'homme serait également très intéressante.

Discussion et perspectives

L'amélioration des méthodes de dépistage, qui permettent de détecter les cancers à un stade plus précoce et l'avancée des recherches en terme de traitements ont contribué au ralentissement de la mortalité dans les lymphomes. Pour se faire, de nouvelles thérapies plus efficaces et plus ciblées ont été développées afin de réduire les effets secondaires, prévenir les risques de rechutes ainsi que d'éventuelles résistances aux traitements. Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques dépend de la façon dont les modèles reproduisent fidèlement la pathologie humaine. Actuellement les modèles cellulaires ne suffisent pas et ne permettent pas de mimer pas fidèlement la pathologie humaine. En effet, ils ne reflètent pas fidèlement la complexité de la modulation du microenvironnement par les cellules tumorales et par conséquent ils ne permettent pas de comprendre les mécanismes d'émergence de la pathologie humaine. Le modèle murin semble le plus adéquat et permet de prendre en compte les altérations génétiques associées à la pathologie humaine, la croissance et l'invasion des cellules tumorales et le microenvironnement tumoral associé à la tumeur. Les modèles murins transgéniques doivent pouvoir mimer la réponse thérapeutique chez l'homme ainsi que les mécanismes impliqués dans la résistance thérapeutique.

La MW est un lymphome B indolent incurable. Ce lymphome, se différencie des autres lymphomes indolents, par l'expansion d'un clone lymphoplasmocytaire de localisation médullaire quasi constante avec sécrétion d'une IgM monoclonale. On observe une différenciation lymphoplasmocytaire ainsi qu'une infiltration des cellules tumorales dans la moelle osseuse. Il est admis que ce lymphome est généralement précédé par une phase asymptomatique au cours de laquelle seule l'IgM monoclonale est détectée dans le sérum (MGUS IgM). La découverte récente de la mutation L265P de *MYD88* activatrice de NF- κ B dans plus de 90% des cas a démontré que la MW est génétiquement distincte des autres lymphomes indolents avec sécrétion d'IgM. *MYD88* apparaît donc comme étant le premier événement oncogénique de la maladie.

C'est pour ces raisons qu'il apparaît comme essentiel de continuer à étudier les effets de la mutation *MYD88* sur les voies de signalisation cellulaire complexes en aval, ainsi que la façon dont ces voies de signalisation peuvent à leur tour promouvoir la croissance et la prolifération des cellules de la MW.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de MW, d'améliorer son traitement, et de connaître le rôle exact de *MYD88* dans l'émergence d'un clone lymphoplasmocytaire à cellules B, il apparaît intéressant, voir indispensable de créer un modèle animal possédant la mutation *MYD88 L265P*. En effet, les recherches sur la MW souffrent d'un manque d'un modèle préclinique pour mieux connaître les événements précoces de la maladie et le rôle de *MYD88* dans la transformation. Au début de ma

thèse nous avons décidé de créer un modèle *Myd88* L252P-Yfp au niveau du locus *Rosa26*. Puis, à partir de 2016, plusieurs modèles d'expression de la mutation humaine ou murine de MYD88 ont été publiés.

Le premier modèle publié en 2016 est un modèle d'expression de la mutation murine L252P avec une insertion du transgène au niveau du locus endogène *Myd88* [282]. Malheureusement, ce modèle ne permet pas de reproduire l'émergence d'un clone lymphoplasmocytaire indolent de type MW. Cela soulève la question de la relation entre la lymphomagenèse des cellules B et la régulation du locus endogène *Myd88* tout au long de la vie des cellules B. En effet, le modèle de Knittel révèle une hypergammaglobulémie polyclonale, et laisse suggérer que l'expansion des cellules B sécrétant des Ig pourrait précéder le développement du lymphome. Cependant dans 60% des cas les souris *Myd88* L252P ont un phénotype caractéristique des DLBCL de type ABC et non MW. Cependant, en 2020, en utilisant la même stratégie que Knittel, Schmidt *et al.* ont récemment publié leur modèle murin et concluent que l'activation continue de MYD88 favorise la survie à long terme des cellules B exprimant une IgM monoclonale entraînant un trouble de type IgM MGUS. Par conséquent, à l'aide de ce modèle, ils suggèrent que MYD88 est suffisante pour induire un état dit « prémalin ». [282]

Wang *et al.* et Sewastinik *et al.* dans leur travaux ont quant à eux rapporté l'effet de la protéine *MYD88* L265P humaine dans les cellules B murines [301] [283]. Dans le modèle de Wang *et al.*, les cellules B murines primaires ont été infectées *ex vivo* par un rétrovirus modifié pour exprimer *MYD88* L265P avant réinjection. Dans ce modèle, une augmentation initiale de la prolifération des cellules B a été observée, suivie d'une apoptose des cellules B d'une manière dépendante de Bim. Il est important de noter qu'aucune augmentation de la sécrétion d'immunoglobulines n'a été signalée. Dans le modèle de Sewastianik *et al.*, le transgène humain loxP-flanked-stop-MYD88L265P a été inséré en aval du gène de la chaîne alpha 1 du collagène de type I (*Col1A1*) de souris et l'expression de MYD88L265P a été induite par croisement avec des souris *AidCre*. Contrairement à notre modèle, il s'agit d'un transgène contenant la version humaine de la mutation et son expression est à un stade plus tardif dans le développement B (stade centre germinatif avec les *Aid-Cre*). Même si quelques caractéristiques de la MW ont été notées telles que l'expansion des cellules lymphoplasmocytaires et l'augmentation des taux sériques d'IgM, aucune transformation LPL n'a été observé. Seule la transformation clonale du DLBCL a été observée certainement parce que l'*AID* est principalement exprimé dans les cellules B du centre germinatif et parce que le promoteur du gène *Col1A1* est très actif dans les fibroblastes et les ostéoblastes. Ce modèle soulève la question de savoir si la temporalité et/ou le modèle d'expression pourrait être importants dans le devenir de la cellule B dirigé par MYD88.

Outre le fait que l'infection rétrovirale des lymphocytes B peut avoir ses propres effets d'interférence, ces modèles soulèvent la question de savoir si la protéine *MYD88 L265P* humaine peut avoir exactement les mêmes propriétés d'activation dans un fond génétique murin.

Le choix des fonds génétiques est également important. Depuis, William Castle, des centaines de souches murines consanguines ont été développées. Après un minimum d'une vingtaine de générations (le plus souvent 40 ou 60), les souris qui naissent sont « des clones » puisque homozygotes à tous les loci et donc génétiquement identiques. Chaque lignée consanguine définit un fond génétique qui lui est propre. Il est alors possible de comparer les différentes lignées, de les croiser, et de comparer ensuite pour différents paramètres les variations potentiellement apparues [302]. En effet, lorsqu'une mutation spontanée survient dans une lignée consanguine, le locus muté est la seule différence génétique entre la lignée d'origine et la lignée portant la mutation. Les deux lignées sont dites co-isogéniques. Cependant, même s'il au sein de la communauté scientifique est souvent recommandé d'étudier l'effet d'un transgène sur une lignée congénique afin de faciliter les comparaisons des données publiées dans la littérature. Cela a pour conséquence de supprimer l'hétérogénéité génétique entre les individus étudiés, et réduire les fluctuations phénotypiques incontrôlées qui caractérisent les pathologies présentes dans la population naturelle.

C'est pour ces raisons que les animaux transgéniques sont souvent produits dans des fonds génétiques hybrides qui de surcroît procurent de meilleurs rendements de transgénèse. Ces animaux possèdent alors un fonds génétique non fixé et non standardisé

En étudiant des modèles hybrides il est possible de caractériser la plupart des maladies génétiques en raison de l'hétérogénéité génétique qu'elles présentent en transférant la mutation dans différentes lignées consanguines, on peut moduler le phénotype pour le rapprocher de formes cliniques particulières de la maladie humaine. En effet, un nombre croissant de publications rapporte que le phénotype d'une mutation, spontanée ou issue d'une mutagenèse ciblée ou aléatoire, varie en fonction du fonds génétique sur lequel elle est placée [303] [304]. Ainsi, la gravité de plusieurs mutations responsables de polykystose rénale dépend de la lignée consanguine sur laquelle elles se trouvent [305]. Autre exemple avec la mutation *ApcMin* (*multiple intestinal neoplasia*) qui affecte le gène *Apc* (*adenomatous polyposis coli*), homologue du gène *APC* de l'homme. Les souris de fonds génétique C57BL/6 hétérozygotes pour cette mutation développent en moyenne 30 tumeurs intestinales, alors que leurs descendants F1 hétérozygotes issus d'un croisement avec la lignée AKR ne présentent en moyenne que 6 polypes [306].

Contrairement aux autres modèles publiés en fond pur C57bl6/J, notre modèle est issu d'un croisement entre les fonds génétiques C57bl/6 (*MYD88 L252P*) et Balb/c (*Cd19-CRE*), cette différence de fond génétique peut être à l'origine de l'apparition du lymphome lymphoplasmocytaire à clonalité IgM de

phénotype indolent. Toutefois, un fait très intéressant est à souligner dans ce modèle. À savoir que chez les souris plus âgées, le lymphome se transforme en lymphome agressif à grande cellules avec un fort pouvoir proliférant (DLBCL de type ABC). Ce phénomène peut être mis en corrélation avec ce qui se passe chez l'homme. En effet il a été rapporté que les patients qui ont des antécédents familiaux de MW ou de MGUS IgM déclare plus précocement la maladie et ont un niveau d'infiltration médullaire plus important comme observé dans notre modèle [264].

De plus, dans nos souris *Cd19-Cre_Myd88 L252P* les cellules tumorales sont localisées majoritairement dans la rate, et non dans la moelle osseuse comme dans la MW humaine. Dans notre modèle murin, cette absence de cellule tumorale dans la moelle osseuse pourrait être due à l'expression précoce de *Myd88 L252P* dans toutes les cellules B. Par conséquent les cellules tumorales pourraient être issues d'une cellule B mature naïve pré-CG semblables aux B blastiques se différenciant directement en plasmocytes à IgM de courte durée de vie. Ces plasmocytes à courte durée de vie migrent peu dans la moelle osseuse. Du fait de l'absence d'hypermutation somatique dans notre modèle, nous ne pouvons pas certifier que le clone soit issu du CG. En effet, il se pourrait que l'expression de la mutation *Myd88 L252P* soit trop précoce pour observer ce phénomène ou alors que ce dernier soit difficilement reproductible chez la souris. Afin de valider cette hypothèse nous développons un modèle murin exprimant la mutation *MYD88 L252P* plus tardivement dans le développement B. Dans ce modèle « Knock-In » pour *MYD88 L252P* le transgène est toujours inséré dans le locus *Rosa26* est sous le contrôle du promoteur du locus de la chaîne J, permettant une expression de *MYD88 L252P* à un stade plus tardif du développement B spécifique des plasmocytes. Ainsi, la cellule B pourra suivre un développement normal jusqu'à la différenciation post-CG est former des plasmocytes à IgM à longue durée de vie, pouvant migrer dans la moelle osseuse.

En dépit de la localisation différente, les tumeurs spléniques dans notre modèle présentent néanmoins de fortes similitudes avec ce qu'il est retrouvé chez l'Homme. Même si quelques gènes sont communs à la signature DBCL de type ABC tels que *IGHM*, *CXCR4* ou *PIMI* et *PIM2*, la signature *MYD88 L252P*, dans notre modèle, pointe vers un dérèglement de la différenciation des plasmocytes. Cela suggère que *MYD88 L252P* peut être considéré comme étant la clé de voûte de la physiopathologie transformatrice de la MW. Cela suggère également que l'activation de *KRAS* pourrait être importante. *RASSF3* et *KRAS* lui-même étaient régulés à la hausse dans les tumeurs à cellules B *MYD88 L252P* et dans la MW humaine. De manière cohérente, et en accord avec les résultats du groupe de Treon [307], nous avons également trouvé une surexpression de *RASSF6* chez les patients MW (résultats NG et JF non publiés). *CXCR4*, dont l'expression est augmentée dans la MW, peut activer la voie RAS à travers les protéines associées à RasGAP [308]. Les mutations les plus fréquentes impliquent les gènes

KRAS et NRAS dans le myélome multiple [309]. Même si de telles mutations n'ont pas été rapportées dans la MW [310], nos résultats mettent en évidence le rôle putatif de la voie d'activation Ras dans la MW, ce qui peut conduire à la conception de nouvelles thérapies.

L'effet du microenvironnement est également à prendre en compte. En effet, ce dernier peut réprimer l'expression de certaines interleukines intervenant dans les phénomènes de migration cellulaire. Ceci pourrait être à l'origine de l'absence de migration des cellules vers la moelle osseuse. Cette répression d'expression peut être attribuée aux cellules Breg. Ces Breg surexpriment à leur surface les récepteurs PD-L1 et PD-L2. Comme nous avons pu le démontrer lors de la caractérisation des aspects immunomodulateurs des cellules B humaines infectées par l'EBV, cette surexpression de PD-L1 favorise l'échappement immunitaire en permettant l'expansion des cellules T régulatrices autologues ainsi que la surexpression des cytokines IL10, IL35 et TGF- β 1. Dans le modèle cellulaire, nous montrons que l'expression de *MYD88 L265P* est associée à une transformation de ces cellules en cellules B régulatrices capables de sécréter certaines cytokines immunosuppressives (IL35, PD-L1 et IL10 en plus faible proportion). De plus l'analyse transcriptomique a permis d'identifier une signature de l'échappement à la réponse immune montrant clairement le pouvoir immunomodulateur de l'activation constitutive de NF- κ B induite par *MYD88 L265P* [311]. De plus, dans notre modèle murin les premières analyses montrent une augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales dans la rate et le sang tout comme chez les patients atteints de la MW.

L'étude récente de Kaushal et al., montre que dès le stade MGUS, le micro-environnement immun est modifié avec une baisse des compartiments myéloïdes et lymphocytaires [265]. Cette augmentation de PD-L1 retrouvée dans nos modèles pourrait être à l'origine de l'épuisement des cellules T. Il serait donc intéressant d'élaborer une nouvelle approche thérapeutique basée sur la technologie des « CAR-T cell ». Les thérapies actuelles pour le traitement des patients MW se concentrent principalement sur le ciblage des cellules cancéreuses directement en utilisant des thérapies combinées. Cela comprend des thérapies telles que le R-CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone plus rituximab) ou l'Ibrutinib. Cependant, ce dernier est administré indéfiniment et peut provoquer des effets indésirables tels que diarrhée, thrombocytopenie, éruption cutanée, saignement atypique, entre autres symptômes d'où l'importance de trouver des traitements efficaces ciblant et inhibant des protéines tel que PD-L1 pour améliorer les immunothérapies actuelles et éviter l'épuisement des cellules T [312].

En résumé, notre étude longitudinale des souris *MYD88 L252P* a démontré que l'activation continue de MYD88 est capable de favoriser l'expansion précoce des cellules IgM lymphoplasmocytaire et des

plasmocytes avec, d'abord, une hyper Ig polyclonale sérique puis un pic d'Ig monoclonale. Les pics d'Ig étaient constamment associés à des lymphomes à cellules B partageant des caractéristiques avec la MW. Deux différences majeures avec la MW étaient la localisation splénique des tumeurs *MYD88* L252P et une prolifération accrue. Ici, nous avons montré pour la première fois que la différenciation des lymphocytes B lymphoplasmocytaires IgM est au cœur du potentiel de transformation de *MYD88* L252P. Ainsi, nous proposons un nouveau modèle préclinique intéressant pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ou pour étudier la surveillance immunitaire par exemple non seulement dans la MW mais aussi dans d'autres lymphomes à cellules B présentant des caractéristiques de différenciation des plasmocytes. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents est nécessaire afin de développer de nouvelles thérapies pour ces cancers des cellules B incurables.

Références bibliographiques

- [1] C. Ouk *et al.*, « Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 641692, mai 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.641692.
- [2] M. D. Cooper et M. N. Alder, « The Evolution of Adaptive Immune Systems », *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 815-822, févr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.001.
- [3] C. E. Bryant et T. P. Monie, « Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity », *Open Biol.*, vol. 2, n° 4, p. 120015, avr. 2012, doi: 10.1098/rsob.120015.
- [4] K. Buchmann, « Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals », *Front. Immunol.*, vol. 5, sept. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00459.
- [5] T. Kawai et S. Akira, « The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors », *Nat. Immunol.*, vol. 11, n° 5, p. 373-384, mai 2010, doi: 10.1038/ni.1863.
- [6] A. L. Hilchie, K. Wuerth, et R. E. W. Hancock, « Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, n° 12, p. 761-768, déc. 2013, doi: 10.1038/nchembio.1393.
- [7] C. L. Bevins et N. H. Salzman, « Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, n° 5, p. 356-368, mai 2011, doi: 10.1038/nrmicro2546.
- [8] Y. Lai et R. L. Gallo, « AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense », *Trends Immunol.*, vol. 30, n° 3, p. 131-141, mars 2009, doi: 10.1016/j.it.2008.12.003.
- [9] M. Burian et B. Schittek, « The secrets of dermcidin action », *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, n° 2, p. 283-286, févr. 2015, doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.012.
- [10] B. Schittek, « The Multiple Facets of Dermcidin in Cell Survival and Host Defense », *J. Innate Immun.*, vol. 4, n° 4, p. 349-360, 2012, doi: 10.1159/000336844.
- [11] T. J. Silhavy, D. Kahne, et S. Walker, « The Bacterial Cell Envelope », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, n° 5, p. a000414-a000414, mai 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [12] W. Dammermann, L. Wollenberg, F. Bentzien, A. Lohse, et S. Lüth, « Toll like receptor 2 agonists lipoteichoic acid and peptidoglycan are able to enhance antigen specific IFN γ release in whole blood during recall antigen responses », *J. Immunol. Methods*, vol. 396, n° 1-2, p. 107-115, oct. 2013, doi: 10.1016/j.jim.2013.08.004.
- [13] R. S. Mahla, « Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology », *Front. Immunol.*, vol. 4, 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00248.
- [14] H. Rus, C. Cudrici, et F. Niculescu, « The Role of the Complement System in Innate Immunity », *Immunol. Res.*, vol. 33, n° 2, p. 103-112, 2005, doi: 10.1385/IR:33:2:103.
- [15] C. Garlanda, B. Bottazzi, A. Bastone, et A. Mantovani, « PENTRAXINS AT THE CROSSROADS BETWEEN INNATE IMMUNITY, INFLAMMATION, MATRIX DEPOSITION, AND FEMALE FERTILITY », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, n° 1, p. 337-366, avr. 2005, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756.
- [16] S. E. Girardin *et al.*, « Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan », *Science*, vol. 300, n° 5625, p. 1584-1587, juin 2003, doi: 10.1126/science.1084677.
- [17] M. Yoneyama *et al.*, « Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity », *J. Immunol.*, vol. 175, n° 5, p. 2851-2858, sept. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.5.2851.
- [18] L. Peiser, S. Mukhopadhyay, et S. Gordon, « Scavenger receptors in innate immunity », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, n° 1, p. 123-128, févr. 2002, doi: 10.1016/S0952-7915(01)00307-7.
- [19] K. Takeda, T. Kaisho, et S. Akira, « Toll-Like Receptors », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, n° 1, p. 335-376, avr. 2003, doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- [20] J. W. Griffith, C. L. Sokol, et A. D. Luster, « Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 32, n° 1, p. 659-702, mars 2014, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
- [21] M. Rabinovitch, « Professional and non-professional phagocytes: an introduction », *Trends Cell Biol.*, vol. 5, n° 3, p. 85-87, mars 1995, doi: 10.1016/S0962-8924(00)88955-2.
- [22] S. W. Kashem, M. Haniffa, et D. H. Kaplan, « Antigen-Presenting Cells in the Skin », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 35, n° 1, p. 469-499, avr. 2017, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052215.

- [23] J. A. Lopez *et al.*, « Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack », *Blood*, vol. 121, n° 14, p. 2659-2668, avr. 2013, doi: 10.1182/blood-2012-07-446146.
- [24] R. D. Wortzel, C. Philipps, et H. Schreiber, « Multiple tumour-specific antigens expressed on a single tumour cell », *Nature*, vol. 304, n° 5922, p. 165-167, juill. 1983, doi: 10.1038/304165a0.
- [25] B. M. Vose et M. Moore, « Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response », *Semin. Hematol.*, vol. 22, n° 1, p. 27-40, janv. 1985.
- [26] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J.-M. Reichhart, et J. A. Hoffmann, « The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults », *Cell*, vol. 86, n° 6, p. 973-983, sept. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80172-5.
- [27] T. H. Chuang et R. J. Ulevitch, « Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9 », *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 11, n° 3, p. 372-378, sept. 2000.
- [28] X. Du, A. Poltorak, Y. Wei, et B. Beutler, « Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution », *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 11, n° 3, p. 362-371, sept. 2000.
- [29] T.-H. Chuang et R. J. Ulevitch, « Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.*, vol. 1518, n° 1-2, p. 157-161, mars 2001, doi: 10.1016/S0167-4781(00)00289-X.
- [30] S. R. El-Zayat, H. Sibaii, et F. A. Manna, « Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview », *Bull. Natl. Res. Cent.*, vol. 43, n° 1, p. 187, déc. 2019, doi: 10.1186/s42269-019-0227-2.
- [31] A. Poltorak, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, et B. Beutler, « Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, n° 5, p. 2163-2167, févr. 2000, doi: 10.1073/pnas.040565397.
- [32] K. Takeda, « Toll-like receptors in innate immunity », *Int. Immunol.*, vol. 17, n° 1, p. 1-14, nov. 2004, doi: 10.1093/intimm/dxh186.
- [33] M. Essakalli, O. Atouf, N. Bennani, N. Benseffaj, S. Ouadghiri, et C. Brick, « Toll-like récepteurs », *Pathol. Biol.*, vol. 57, n° 5, p. 430-438, juill. 2009, doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.003.
- [34] E. Latz *et al.*, « Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9 », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 7, p. 772-779, juill. 2007, doi: 10.1038/ni1479.
- [35] T. Kawai et S. Akira, « TLR signaling », *Cell Death Differ.*, vol. 13, n° 5, p. 816-825, mai 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401850.
- [36] S. Akira, S. Uematsu, et O. Takeuchi, « Pathogen Recognition and Innate Immunity », *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 783-801, févr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [37] N. J. Gay, M. F. Symmons, M. Gangloff, et C. E. Bryant, « Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, n° 8, p. 546-558, août 2014, doi: 10.1038/nri3713.
- [38] L. A. J. O'Neill et A. G. Bowie, « The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 5, p. 353-364, mai 2007, doi: 10.1038/nri2079.
- [39] T. Horng, G. M. Barton, R. A. Flavell, et R. Medzhitov, « The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors », *Nature*, vol. 420, n° 6913, p. 329-333, nov. 2002, doi: 10.1038/nature01180.
- [40] M. Yamamoto *et al.*, « Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4 », *Nature*, vol. 420, n° 6913, p. 324-329, nov. 2002, doi: 10.1038/nature01182.
- [41] C. Bovijn, A.-S. Desmet, I. Uyttendaele, T. Van Acker, J. Tavernier, et F. Peelman, « Identification of Binding Sites for Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88) and Toll-like Receptor 4 in MyD88 Adapter-like (Mal) », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 17, p. 12054-12066, avr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.415810.
- [42] R. Medzhitov *et al.*, « MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways », *Mol. Cell*, vol. 2, n° 2, p. 253-258, août 1998, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80136-7.
- [43] G. Hardiman, F. L. Rock, S. Balasubramanian, R. A. Kastelein, et J. F. Bazan, « Molecular characterization and modular analysis of human MyD88 », *Oncogene*, vol. 13, n° 11, p. 2467-2475, déc. 1996.
- [44] K. A. Lord, B. Hoffman-Liebermann, et D. A. Liebermann, « Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6 », *Oncogene*, vol. 5, n° 7, p. 1095-1097, juill. 1990.

- [45] L. A. J. O'Neill, A. Dunne, M. Edjeback, P. Gray, C. Jefferies, et C. Wietek, « Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors », *J. Endotoxin Res.*, vol. 9, n° 1, p. 55-59, févr. 2003, doi: 10.1179/096805103125001351.
- [46] L. A. J. O'Neill, « The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, n° 3, p. 643-647, juin 2003, doi: 10.1042/bst0310643.
- [47] M. R. Thompson, J. J. Kaminski, E. A. Kurt-Jones, et K. A. Fitzgerald, « Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection », *Viruses*, vol. 3, n° 6, p. 920-940, juin 2011, doi: 10.3390/v3060920.
- [48] S. Akira, « Toll-like Receptor Signaling », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 40, p. 38105-38108, oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.R300028200.
- [49] K. Burns *et al.*, « MyD88, an Adapter Protein Involved in Interleukin-1 Signaling », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 20, p. 12203-12209, mai 1998, doi: 10.1074/jbc.273.20.12203.
- [50] S. Janssens et R. Beyaert, « Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) Family Members », *Mol. Cell*, vol. 11, n° 2, p. 293-302, févr. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00053-4.
- [51] S.-C. Lin, Y.-C. Lo, et H. Wu, « Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling », *Nature*, vol. 465, n° 7300, p. 885-890, juin 2010, doi: 10.1038/nature09121.
- [52] P. G. Motshwene *et al.*, « An Oligomeric Signaling Platform Formed by the Toll-like Receptor Signal Transducers MyD88 and IRAK-4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 37, p. 25404-25411, sept. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.022392.
- [53] K. R. Balka et D. Nardo, « Understanding early TLR signaling through the Myddosome », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 105, n° 2, p. 339-351, févr. 2019, doi: 10.1002/JLB.MR0318-096R.
- [54] T. Kawagoe *et al.*, « Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2 », *Nat. Immunol.*, vol. 9, n° 6, p. 684-691, juin 2008, doi: 10.1038/ni.1606.
- [55] S. Janssens et R. Beyaert, « A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 27, n° 9, p. 474-482, sept. 2002, doi: 10.1016/S0968-0004(02)02145-X.
- [56] R. M. Hofmann et C. M. Pickart, « Noncanonical MMS2-Encoded Ubiquitin-Conjugating Enzyme Functions in Assembly of Novel Polyubiquitin Chains for DNA Repair », *Cell*, vol. 96, n° 5, p. 645-653, mars 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80575-9.
- [57] L. Deng *et al.*, « Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain », *Cell*, vol. 103, n° 2, p. 351-361, oct. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00126-4.
- [58] L. Verstrepen, T. Bekaert, T.-L. Chau, J. Tavernier, A. Chariot, et R. Beyaert, « TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, n° 19, p. 2964-2978, oct. 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8064-8.
- [59] E. F. Kenny et L. A. J. O'Neill, « Signalling adaptors used by Toll-like receptors: An update », *Cytokine*, vol. 43, n° 3, p. 342-349, sept. 2008, doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.010.
- [60] C. Wang, L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, et Z. J. Chen, « TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK », *Nature*, vol. 412, n° 6844, p. 346-351, juill. 2001, doi: 10.1038/35085597.
- [61] J. Ninomiya-Tsuji, K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, et K. Matsumoto, « The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway », *Nature*, vol. 398, n° 6724, p. 252-256, mars 1999, doi: 10.1038/18465.
- [62] Ij. M. Kramer, « Activation of the Innate Immune System », in *Signal Transduction*, Elsevier, 2016, p. 741-775. doi: 10.1016/B978-0-12-394803-8.00013-9.
- [63] O. Takeuchi et S. Akira, « Pattern Recognition Receptors and Inflammation », *Cell*, vol. 140, n° 6, p. 805-820, mars 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- [64] K. Honda et T. Taniguchi, « Toll-like receptor signaling and IRF transcription factors », *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life*, vol. 58, n° 5-6, p. 290-295, mai 2006, doi: 10.1080/15216540600702206.
- [65] D. B. Iliiev, M. Sobhkhaz, K. Fremmerlid, et J. B. Jørgensen, « MyD88 Interacts with Interferon Regulatory Factor (IRF) 3 and IRF7 in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 49, p. 42715-42724, déc. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.293969.
- [66] A. Takaoka *et al.*, « Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors », *Nature*, vol. 434, n° 7030, p. 243-249, mars 2005, doi: 10.1038/nature03308.

- [67] T. Kawai et S. Akira, « SnapShot: Pattern-Recognition Receptors », *Cell*, vol. 129, n° 5, p. 1024.e1-1024.e2, juin 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.05.017.
- [68] A. S. Dhillion, S. Hagan, O. Rath, et W. Kolch, « MAP kinase signalling pathways in cancer », *Oncogene*, vol. 26, n° 22, p. 3279-3290, mai 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210421.
- [69] L. Chang et M. Karin, « Mammalian MAP kinase signalling cascades », *Nature*, vol. 410, n° 6824, p. 37-40, mars 2001, doi: 10.1038/35065000.
- [70] A. J. Whitmarsh et R. J. Davis, « Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways », *J. Mol. Med.*, vol. 74, n° 10, p. 589-607, oct. 1996, doi: 10.1007/s001090050063.
- [71] A. G. Papavassiliou, M. Treier, et D. Bohmann, « Intramolecular signal transduction in c-Jun », *EMBO J.*, vol. 14, n° 9, p. 2014-2019, mai 1995.
- [72] P. Angel et M. Karin, « The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1072, n° 2-3, p. 129-157, déc. 1991, doi: 10.1016/0304-419X(91)90011-9.
- [73] Y. Hao et al., « c-Fos mediates α 1, 2-fucosyltransferase 1 and Lewis χ ₂ expression in response to TGF- β 1 in ovarian cancer », *Oncol. Rep.*, oct. 2017, doi: 10.3892/or.2017.6052.
- [74] « The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases », *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 351, n° 1336, p. 127-134, févr. 1996, doi: 10.1098/rstb.1996.0008.
- [75] M. S. Hayden et S. Ghosh, « Shared Principles in NF- κ B Signaling », *Cell*, vol. 132, n° 3, p. 344-362, févr. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
- [76] S. Vallabhapurapu et M. Karin, « Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, n° 1, p. 693-733, avr. 2009, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- [77] K. Yamamoto et al., « Mapping of cyclosporin A binding sites in cyclophilin A by using synthetic peptides », *Regul. Pept.*, vol. 59, n° 1, p. 23-30, sept. 1995, doi: 10.1016/0167-0115(95)00067-L.
- [78] R. Sen et D. Baltimore, « Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism », *Cell*, vol. 47, n° 6, p. 921-928, déc. 1986, doi: 10.1016/0092-8674(86)90807-X.
- [79] L. M. Staudt, « Oncogenic Activation of NF- κ B », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, n° 6, p. a000109-a000109, juin 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000109.
- [80] C. Lyu et al., « IRAK-M Deficiency Exacerbates Ischemic Neurovascular Injuries in Experimental Stroke Mice », *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, p. 504, déc. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00504.
- [81] K. Kobayashi, L. D. Hernandez, J. E. Galán, C. A. Janeway, R. Medzhitov, et R. A. Flavell, « IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling », *Cell*, vol. 110, n° 2, p. 191-202, juill. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00827-9.
- [82] T. Kawai, O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, et S. Akira, « Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin », *Immunity*, vol. 11, n° 1, p. 115-122, juill. 1999, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80086-2.
- [83] K. Hoebe, X. Du, J. Goode, N. Mann, et B. Beutler, « *l*-Lps2: a new locus required for responses to lipopolysaccharide, revealed by germline mutagenesis and phenotypic screening », *J. Endotoxin Res.*, vol. 9, n° 4, p. 250-255, août 2003, doi: 10.1179/096805103225001459.
- [84] E. M. Palsson-McDermott et al., « TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 6, p. 579-586, juin 2009, doi: 10.1038/ni.1727.
- [85] Y. C. Park, V. Burkitt, A. R. Villa, L. Tong, et H. Wu, « Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2 », *Nature*, vol. 398, n° 6727, p. 533-538, avr. 1999, doi: 10.1038/19110.
- [86] M. Carty, R. Goodbody, M. Schröder, J. Stack, P. N. Moynagh, et A. G. Bowie, « The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling », *Nat. Immunol.*, vol. 7, n° 10, p. 1074-1081, oct. 2006, doi: 10.1038/ni1382.
- [87] M. Karin et Y. Ben-Neriah, « Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, n° 1, p. 621-663, avr. 2000, doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.
- [88] A. Dunne et L. A. J. O'Neill, « The Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense », *Sci. STKE*, vol. 2003, n° 171, févr. 2003, doi: 10.1126/stke.2003.171.re3.

- [89] Z. J. Chen, L. Parent, et T. Maniatis, « Site-Specific Phosphorylation of I κ B α by a Novel Ubiquitination-Dependent Protein Kinase Activity », *Cell*, vol. 84, n^o 6, p. 853-862, mars 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81064-8.
- [90] F. Mercurio *et al.*, « IKK-1 and IKK-2: Cytokine-Activated I κ B Kinases Essential for NF- κ B Activation », *Science*, vol. 278, n^o 5339, p. 860-866, oct. 1997, doi: 10.1126/science.278.5339.860.
- [91] J. D. Woronicz, X. Gao, Z. Cao, M. Rothe, et D. V. Goeddel, « I κ B Kinase- β : NF- κ B Activation and Complex Formation with I κ B Kinase- α and NIK », *Science*, vol. 278, n^o 5339, p. 866-870, oct. 1997, doi: 10.1126/science.278.5339.866.
- [92] E. Zandi, Y. Chen, et M. Karin, « Direct Phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : Discrimination Between Free and NF- κ B-Bound Substrate », *Science*, vol. 281, n^o 5381, p. 1360-1363, août 1998, doi: 10.1126/science.281.5381.1360.
- [93] A. Oeckinghaus et S. Ghosh, « The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, n^o 4, p. a000034-a000034, oct. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- [94] M. J. May, R. B. Marienfeld, et S. Ghosh, « Characterization of the I κ B-kinase NEMO Binding Domain », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n^o 48, p. 45992-46000, nov. 2002, doi: 10.1074/jbc.M206494200.
- [95] M. J. May, F. D'Acquisto, L. A. Madge, J. Glöckner, J. S. Pober, et S. Ghosh, « Selective Inhibition of NF- κ B Activation by a Peptide That Blocks the Interaction of NEMO with the I κ B Kinase Complex », *Science*, vol. 289, n^o 5484, p. 1550-1554, sept. 2000, doi: 10.1126/science.289.5484.1550.
- [96] P. Dobrzanski, R. P. Ryseck, et R. Bravo, « Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100 », *Oncogene*, vol. 10, n^o 5, p. 1003-1007, mars 1995.
- [97] U. Senftleben *et al.*, « Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF- κ B Signaling Pathway », *Science*, vol. 293, n^o 5534, p. 1495-1499, août 2001, doi: 10.1126/science.1062677.
- [98] Z. B. Yilmaz, « RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF », *EMBO J.*, vol. 22, n^o 1, p. 121-130, janv. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg004.
- [99] N. Ishimaru, H. Kishimoto, Y. Hayashi, et J. Sprent, « Regulation of naive T cell function by the NF- κ B2 pathway », *Nat. Immunol.*, vol. 7, n^o 7, p. 763-772, juill. 2006, doi: 10.1038/ni1351.
- [100] S. Basak *et al.*, « A Fourth I κ B Protein within the NF- κ B Signaling Module », *Cell*, vol. 128, n^o 2, p. 369-381, janv. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2006.12.033.
- [101] N. R. Rice, M. L. MacKichan, et A. Israël, « The precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions », *Cell*, vol. 71, n^o 2, p. 243-253, oct. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90353-E.
- [102] M. Naumann, A. Nieters, E. N. Hatada, et C. Scheidereit, « NF- κ B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF- κ B/rel-factors », *Oncogene*, vol. 8, n^o 8, p. 2275-2281, août 1993.
- [103] N. J. Solan, H. Miyoshi, E. M. Carmona, G. D. Bren, et C. V. Paya, « RelB Cellular Regulation and Transcriptional Activity Are Regulated by p100 », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n^o 2, p. 1405-1418, janv. 2002, doi: 10.1074/jbc.M109619200.
- [104] S. Cohen, H. Achbert-Weiner, et A. Ciechanover, « Dual Effects of I κ B Kinase β -Mediated Phosphorylation on p105 Fate: SCF ^{β -TrCP}-Dependent Degradation and SCF ^{β -TrCP}-Independent Processing », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n^o 1, p. 475-486, janv. 2004, doi: 10.1128/MCB.24.1.475-486.2004.
- [105] N. D. Perkins, « Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway », *Oncogene*, vol. 25, n^o 51, p. 6717-6730, oct. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209937.
- [106] S. Malek, D.-B. Huang, T. Huxford, S. Ghosh, et G. Ghosh, « X-ray Crystal Structure of an I κ B β -NF- κ B p65 Homodimer Complex », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n^o 25, p. 23094-23100, juin 2003, doi: 10.1074/jbc.M301022200.
- [107] A. Hoffmann, « Genetic analysis of NF- κ B/Rel transcription factors defines functional specificities », *EMBO J.*, vol. 22, n^o 20, p. 5530-5539, oct. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg534.
- [108] M. Karin, « Nuclear factor- κ B in cancer development and progression », *Nature*, vol. 441, n^o 7092, p. 431-436, mai 2006, doi: 10.1038/nature04870.
- [109] S. Nisitani, A. B. Satterthwaite, K. Akashi, I. L. Weissman, O. N. Witte, et M. I. Wahl, « Posttranscriptional regulation of Bruton's tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, n^o 6, p. 2737-2742, mars 2000, doi: 10.1073/pnas.050583597.

- [110] N. F. Go *et al.*, « Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. », *J. Exp. Med.*, vol. 172, n° 6, p. 1625-1631, déc. 1990, doi: 10.1084/jem.172.6.1625.
- [111] D. Hata *et al.*, « Involvement of Bruton's Tyrosine Kinase in FcεRI-dependent Mast Cell Degranulation and Cytokine Production », *J. Exp. Med.*, vol. 187, n° 8, p. 1235-1247, avr. 1998, doi: 10.1084/jem.187.8.1235.
- [112] F. M. Uckun, « Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a dual-function regulator of apoptosis », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 56, n° 6, p. 683-691, sept. 1998, doi: 10.1016/S0006-2952(98)00122-1.
- [113] T. Wen, J. Wang, Y. Shi, H. Qian, et P. Liu, « Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances », *Leukemia*, vol. 35, n° 2, p. 312-332, févr. 2021, doi: 10.1038/s41375-020-01072-6.
- [114] C. A. Jefferies *et al.*, « Bruton's Tyrosine Kinase Is a Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-binding Protein That Participates in Nuclear Factor κB Activation by Toll-like Receptor 4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 28, p. 26258-26264, juill. 2003, doi: 10.1074/jbc.M301484200.
- [115] J. J. Castillo, Z. R. Hunter, G. Yang, et S. P. Treon, « Novel approaches to targeting MYD88 in Waldenström macroglobulinemia », *Expert Rev. Hematol.*, vol. 10, n° 8, p. 739-744, août 2017, doi: 10.1080/17474086.2017.1343661.
- [116] N. J. Horwood *et al.*, « Bruton's Tyrosine Kinase Is Required For Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor α Production », *J. Exp. Med.*, vol. 197, n° 12, p. 1603-1611, juin 2003, doi: 10.1084/jem.20021845.
- [117] R. Perezdediego *et al.*, « Bruton's tyrosine kinase is not essential for LPS-induced activation of human monocytes », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, n° 6, p. 1462-1469, juin 2006, doi: 10.1016/j.jaci.2006.01.037.
- [118] F. M. Uckun, « Clinical Potential of Targeting Bruton's Tyrosine Kinase », *Int. Rev. Immunol.*, vol. 27, n° 1-2, p. 43-69, janv. 2008, doi: 10.1080/08830180701784588.
- [119] T. C. Islam et C. I. E. Smith, « The cellular phenotype conditions Btk for cell survival or apoptosis signaling: Btk in B-cell survival and apoptosis », *Immunol. Rev.*, vol. 178, n° 1, p. 49-63, déc. 2000, doi: 10.1034/j.1600-065X.2000.17811.x.
- [120] H. J. Coope, « CD40 regulates the processing of NF-κappaB2 p100 to p52 », *EMBO J.*, vol. 21, n° 20, p. 5375-5385, oct. 2002, doi: 10.1093/emboj/cdf542.
- [121] E. Dejardin, « The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, n° 9, p. 1161-1179, oct. 2006, doi: 10.1016/j.bcp.2006.08.007.
- [122] T. Lawrence, M. Bebién, G. Y. Liu, V. Nizet, et M. Karin, « IKKα limits macrophage NF-κB activation and contributes to the resolution of inflammation », *Nature*, vol. 434, n° 7037, p. 1138-1143, avr. 2005, doi: 10.1038/nature03491.
- [123] C. Liang, M. Zhang, et S.-C. Sun, « β-TrCP binding and processing of NF-κB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870 », *Cell. Signal.*, vol. 18, n° 8, p. 1309-1317, août 2006, doi: 10.1016/j.cellsig.2005.10.011.
- [124] R. E. Amir, H. Haecker, M. Karin, et A. Ciechanover, « Mechanism of processing of the NF-κB2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCFβ-TrCP ubiquitin ligase », *Oncogene*, vol. 23, n° 14, p. 2540-2547, avr. 2004, doi: 10.1038/sj.onc.1207366.
- [125] J.-P. Pradere, D. H. Dapito, et R. F. Schwabe, « The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer », *Oncogene*, vol. 33, n° 27, p. 3485-3495, juill. 2014, doi: 10.1038/onc.2013.302.
- [126] N. Singh, D. Baby, J. Rajguru, P. Patil, S. Thakkannavar, et V. Pujari, « Inflammation and cancer », *Ann. Afr. Med.*, vol. 18, n° 3, p. 121, 2019, doi: 10.4103/aam.aam_56_18.
- [127] R. Salcedo, C. Cataisson, U. Hasan, S. H. Yuspa, et G. Trinchieri, « MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis », *Trends Immunol.*, vol. 34, n° 8, p. 379-389, août 2013, doi: 10.1016/j.it.2013.03.008.
- [128] E. L. Wang *et al.*, « High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 102, n° 5, p. 908-915, mars 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605558.

- [129] Eun Mi Je, Sung Soo Kim, Nam Jin Yoo, et Sug Hyung Lee, « Mutational and expressional analyses of MYD88 gene in common solid cancers », *Tumori*, n° 2012September-October, sept. 2012, doi: 10.1700/1190.13209.
- [130] J. A. DiDonato, F. Mercurio, et M. Karin, « NF-κB and the link between inflammation and cancer: NF-κB links inflammation and cancer », *Immunol. Rev.*, vol. 246, n° 1, p. 379-400, mars 2012, doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x.
- [131] L. Macedo, G. Pinhal-Enfield, V. Alshits, G. Elson, B. N. Cronstein, et S. J. Leibovich, « Wound Healing Is Impaired in MyD88-Deficient Mice », *Am. J. Pathol.*, vol. 171, n° 6, p. 1774-1788, déc. 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.061048.
- [132] S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, et R. Medzhitov, « Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis », *Cell*, vol. 118, n° 2, p. 229-241, juill. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002.
- [133] Y. Iimuro, E. Seki, G. Son, H. Tsutsui, K. Nakanishi, et J. Fujimoto, « Role of innate immune response in liver regeneration », *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 22, n° s1, p. S57-S58, juin 2007, doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04651.x.
- [134] A. Ochi *et al.*, « MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells », *J. Exp. Med.*, vol. 209, n° 9, p. 1671-1687, août 2012, doi: 10.1084/jem.20111706.
- [135] S. Vaishnava *et al.*, « The Antibacterial Lectin RegIII γ Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine », *Science*, vol. 334, n° 6053, p. 255-258, oct. 2011, doi: 10.1126/science.1209791.
- [136] F. Hayashi *et al.*, « The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 », *Nature*, vol. 410, n° 6832, p. 1099-1103, avr. 2001, doi: 10.1038/35074106.
- [137] H. zur Hausen, *Infections Causing Human Cancer*, 1^{re} éd. Wiley, 2006. doi: 10.1002/3527609318.
- [138] L. Apetoh *et al.*, « Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy », *Nat. Med.*, vol. 13, n° 9, p. 1050-1059, sept. 2007, doi: 10.1038/nm1622.
- [139] J. B. Swann *et al.*, « Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 2, p. 652-656, janv. 2008, doi: 10.1073/pnas.0708594105.
- [140] W. E. Naugler *et al.*, « Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production », *Science*, vol. 317, n° 5834, p. 121-124, juill. 2007, doi: 10.1126/science.1140485.
- [141] S. Rakoff-Nahoum et R. Medzhitov, « Regulation of Spontaneous Intestinal Tumorigenesis Through the Adaptor Protein MyD88 », *Science*, vol. 317, n° 5834, p. 124-127, juill. 2007, doi: 10.1126/science.1140488.
- [142] G. P. Boivin *et al.*, « Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations », *Gastroenterology*, vol. 124, n° 3, p. 762-777, mars 2003, doi: 10.1053/gast.2003.50094.
- [143] J. M. Uronis, M. Mühlbauer, H. H. Herfarth, T. C. Rubinas, G. S. Jones, et C. Jobin, « Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility », *PLoS ONE*, vol. 4, n° 6, p. e6026, juin 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006026.
- [144] R. Salcedo *et al.*, « MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18 », *J. Exp. Med.*, vol. 207, n° 8, p. 1625-1636, août 2010, doi: 10.1084/jem.20100199.
- [145] S. L. Pull, J. M. Doherty, J. C. Mills, J. I. Gordon, et T. S. Stappenbeck, « Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n° 1, p. 99-104, janv. 2005, doi: 10.1073/pnas.0405979102.
- [146] E. L. Lowe *et al.*, « Toll-Like Receptor 2 Signaling Protects Mice from Tumor Development in a Mouse Model of Colitis-Induced Cancer », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 9, p. e13027, sept. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013027.
- [147] M. Fukata *et al.*, « Toll-Like Receptor-4 Promotes the Development of Colitis-Associated Colorectal Tumors », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 6, p. 1869-1869.e14, déc. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.09.008.

- [148] L. Wang, K. Yu, X. Zhang, et S. Yu, « Dual functional roles of the MyD88 signaling in colorectal cancer development », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 107, p. 177-184, nov. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.139.
- [149] J. Chen *et al.*, « Expression and Significance of MyD88 in Patients With Gastric Cardia Cancer in a High-Incidence Area of China », *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 559, mai 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00559.
- [150] C. L. Kennedy *et al.*, « Differential role of MyD88 and Mal/TIRAP in TLR2-mediated gastric tumorigenesis », *Oncogene*, vol. 33, n° 19, p. 2540-2546, mai 2014, doi: 10.1038/onc.2013.205.
- [151] H. Tye *et al.*, « STAT3-Driven Upregulation of TLR2 Promotes Gastric Tumorigenesis Independent of Tumor Inflammation », *Cancer Cell*, vol. 22, n° 4, p. 466-478, oct. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.010.
- [152] L. Mandell *et al.*, « Intact Gram-Negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* Bacteria Activate Innate Immunity via Toll-Like Receptor 2 but Not Toll-Like Receptor 4 », *Infect. Immun.*, vol. 72, n° 11, p. 6446-6454, nov. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.11.6446-6454.2004.
- [153] W.-Q. Xiang, W.-F. Feng, W. Ke, Z. Sun, Z. Chen, et W. Liu, « Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway », *J. Hepatol.*, vol. 54, n° 1, p. 26-33, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.006.
- [154] B. Liang *et al.*, « Myeloid Differentiation Factor 88 Promotes Growth and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma », *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, n° 11, p. 2905-2916, juin 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1245.
- [155] V. N. Ngo *et al.*, « Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma », *Nature*, vol. 470, n° 7332, p. 115-119, févr. 2011, doi: 10.1038/nature09671.
- [156] S. Dubois *et al.*, « Biological and Clinical Relevance of Associated Genomic Alterations in MYD88 L265P and non-L265P–Mutated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Analysis of 361 Cases », *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, n° 9, p. 2232-2244, mai 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1922.
- [157] S. P. Treon *et al.*, « MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, n° 9, p. 826-833, août 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1200710.
- [158] S. P. Treon, Y. Cao, L. Xu, G. Yang, X. Liu, et Z. R. Hunter, « Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia », *Blood*, vol. 123, n° 18, p. 2791-2796, mai 2014, doi: 10.1182/blood-2014-01-550905.
- [159] Z. R. Hunter *et al.*, « The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis », *Blood*, vol. 123, n° 11, p. 1637-1646, mars 2014, doi: 10.1182/blood-2013-09-525808.
- [160] J. Rovira *et al.*, « MYD88 L265P Mutations, But No Other Variants, Identify a Subpopulation of DLBCL Patients of Activated B-cell Origin, Extranodal Involvement, and Poor Outcome », *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, n° 11, p. 2755-2764, juin 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1525.
- [161] D. Rossi *et al.*, « Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia », *Blood*, vol. 121, n° 8, p. 1403-1412, févr. 2013, doi: 10.1182/blood-2012-09-458265.
- [162] X. S. Puente *et al.*, « Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia », *Nature*, vol. 475, n° 7354, p. 101-105, juill. 2011, doi: 10.1038/nature10113.
- [163] L. Xu *et al.*, « MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction », *Blood*, vol. 121, n° 11, p. 2051-2058, mars 2013, doi: 10.1182/blood-2012-09-454355.
- [164] M. Varettoni *et al.*, « Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms », *Blood*, vol. 121, n° 13, p. 2522-2528, mars 2013, doi: 10.1182/blood-2012-09-457101.
- [165] X. Yu *et al.*, « MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies », *Cancer Res.*, vol. 78, n° 10, p. 2457-2462, mai 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0215.
- [166] C. Zhan, R. Qi, G. Wei, E. Guven-Maiorov, R. Nussinov, et B. Ma, « Conformational dynamics of cancer-associated MyD88-TIR domain mutant L252P (L265P) allosterically tilts the landscape toward homo-dimerization », *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 29, n° 9, p. 347-354, sept. 2016, doi: 10.1093/protein/gzw033.

- [167] S. Jiang *et al.*, « Genomic Alterations and MYD88MUT Variant Mapping in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Response to Ibrutinib », *Target. Oncol.*, vol. 15, n° 2, p. 221-230, avr. 2020, doi: 10.1007/s11523-020-00710-4.
- [168] W. Shuai *et al.*, « Clinicopathological characterization of chronic lymphocytic leukemia with MYD88 mutations: L265P and non-L265P mutations are associated with different features », *Blood Cancer J.*, vol. 10, n° 8, p. 86, août 2020, doi: 10.1038/s41408-020-00351-w.
- [169] M. Burnet, « Cancer--A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation », *BMJ*, vol. 1, n° 5022, p. 779-786, avr. 1957, doi: 10.1136/bmj.1.5022.779.
- [170] D. Ribatti, « The concept of immune surveillance against tumors: The first theories », *Oncotarget*, vol. 8, n° 4, p. 7175-7180, janv. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.12739.
- [171] M. Challa-Malladi *et al.*, « Combined Genetic Inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma », *Cancer Cell*, vol. 20, n° 6, p. 728-740, déc. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.006.
- [172] M. R. Green *et al.*, « Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 10, p. E1116-E1125, mars 2015, doi: 10.1073/pnas.1501199112.
- [173] W. Béguélin *et al.*, « IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs », *Leukemia*, vol. 29, n° 8, p. 1684-1694, août 2015, doi: 10.1038/leu.2015.57.
- [174] L. Xerri, E. Devilard, J. Hassoun, D. Olive, et F. Birg, « In vivo expression of the CTLA4 inhibitory receptor in malignant and reactive cells from Human lymphomas », *J. Pathol.*, vol. 183, n° 2, p. 182-187, oct. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199710)183:2<182::AID-PATH918>3.0.CO;2-I.
- [175] P. Gravelle *et al.*, « Impaired functional responses in follicular lymphoma CD8⁺ TIM-3⁺ T lymphocytes following TCR engagement », *Oncolimmunology*, vol. 5, n° 10, p. e1224044, oct. 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1224044.
- [176] H. Auclair *et al.*, « EBV Latency III-Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1-Dependent Manner », *J. Immunol.*, vol. 203, n° 6, p. 1665-1674, sept. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1801420.
- [177] M. Saifi *et al.*, « High ratio of interfollicular CD8/FOXP3-positive regulatory T cells is associated with a high FLIPI index and poor overall survival in follicular lymphoma », *Exp. Ther. Med.*, vol. 1, n° 6, p. 933-938, 2010, doi: 10.3892/etm.2010.146.
- [178] P. Amé-Thomas et K. Tarte, « The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 24, p. 23-32, févr. 2014, doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.001.
- [179] P. Serafini, S. Mgebrouff, K. Noonan, et I. Borrello, « Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 13, p. 5439-5449, juill. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621.
- [180] I. Azzaoui *et al.*, « T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells », *Blood*, vol. 128, n° 8, p. 1081-1092, août 2016, doi: 10.1182/blood-2015-08-662783.
- [181] S. Durand-Panteix *et al.*, « B7-H1, Which Represses EBV-Immortalized B Cell Killing by Autologous T and NK Cells, Is Oppositely Regulated by c-Myc and EBV Latency III Program at Both mRNA and Secretory Lysosome Levels », *J. Immunol.*, vol. 189, n° 1, p. 181-190, juill. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102277.
- [182] M. Larsen, V. Appay, et D. Sauce, « Influence de PD-1 sur la synapse immunologique: Une facette de la régulation immunitaire ? », *médecine/sciences*, vol. 29, n° 12, p. 1080-1082, déc. 2013, doi: 10.1051/medsci/20132912006.
- [183] P. Armand, « Checkpoint blockade in lymphoma », *Hematology*, vol. 2015, n° 1, p. 69-73, déc. 2015, doi: 10.1182/asheducation-2015.1.69.
- [184] C. Laurent *et al.*, « Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas », *Oncolimmunology*, vol. 4, n° 8, p. e1026530, août 2015, doi: 10.1080/2162402X.2015.1026530.
- [185] D. J. Andorsky, R. E. Yamada, J. Said, G. S. Pinkus, D. J. Betting, et J. M. Timmerman, « Programmed Death Ligand 1 Is Expressed by Non-Hodgkin Lymphomas and Inhibits the Activity of Tumor-Associated T Cells », *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, n° 13, p. 4232-4244, juill. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2660.

- [186] B. J. Chen *et al.*, « PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies », *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, n° 13, p. 3462-3473, juill. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0855.
- [187] R. Flümman *et al.*, « An Autochthonous Mouse Model of *Myd88* - and *BCL2* -Driven Diffuse Large B-cell Lymphoma Reveals Actionable Molecular Vulnerabilities », *Blood Cancer Discov.*, vol. 2, n° 1, p. 70-91, janv. 2021, doi: 10.1158/2643-3230.BCD-19-0059.
- [188] M. Gupta *et al.*, « Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation », *Blood*, vol. 119, n° 12, p. 2844-2853, mars 2012, doi: 10.1182/blood-2011-10-388538.
- [189] J.-W. Choi, Y. Kim, J.-H. Lee, et Y.-S. Kim, « MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma », *Hum. Pathol.*, vol. 44, n° 7, p. 1375-1381, juill. 2013, doi: 10.1016/j.humpath.2012.10.026.
- [190] M. R. Green *et al.*, « Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma », *Blood*, vol. 116, n° 17, p. 3268-3277, oct. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-05-282780.
- [191] P. Armand, « Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies », *Blood*, vol. 125, n° 22, p. 3393-3400, mai 2015, doi: 10.1182/blood-2015-02-567453.
- [192] S. M. Ansell *et al.*, « PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, n° 4, p. 311-319, janv. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1411087.
- [193] P. Armand *et al.*, « Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure », *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, n° 31, p. 3733-3739, nov. 2016, doi: 10.1200/JCO.2016.67.3467.
- [194] S. M. Ansell, « Targeting immune checkpoints in lymphoma », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 22, n° 4, p. 337-342, juill. 2015, doi: 10.1097/MOH.000000000000158.
- [195] R. Berger *et al.*, « Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies », *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, n° 10, p. 3044-3051, mai 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4079.
- [196] D. G. Haller, « Non-Hodgkin's lymphomas », *Med. Clin. North Am.*, vol. 68, n° 3, p. 741-756, mai 1984, doi: 10.1016/S0025-7125(16)31126-9.
- [197] The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, « A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma », *Blood*, vol. 89, n° 11, p. 3909-3918, juin 1997, doi: 10.1182/blood.V89.11.3909.
- [198] A. Smith, D. Howell, R. Patmore, A. Jack, et E. Roman, « Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network », *Br. J. Cancer*, vol. 105, n° 11, p. 1684-1692, nov. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.450.
- [199] A. Smith *et al.*, « The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population based epidemiology and health service research », *Br. J. Haematol.*, vol. 148, n° 5, p. 739-753, mars 2010, doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08010.x.
- [200] S. H. Swerdlow *et al.*, « The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms », *Blood*, vol. 127, n° 20, p. 2375-2390, mai 2016, doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
- [201] M. Frick, B. Dörken, et G. Lenz, « The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma », *Ther. Adv. Hematol.*, vol. 2, n° 6, p. 369-379, déc. 2011, doi: 10.1177/2040620711419001.
- [202] G. Lenz *et al.*, « Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 22, p. 2313-2323, nov. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0802885.
- [203] G. Lenz *et al.*, « Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 36, p. 13520-13525, sept. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804295105.
- [204] R. Camicia, H. C. Winkler, et P. O. Hassa, « Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review », *Mol. Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 207, déc. 2015, doi: 10.1186/s12943-015-0474-2.
- [205] A. Rosenwald *et al.*, « The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, n° 25, p. 1937-1947, juin 2002, doi: 10.1056/NEJMoa012914.

- [206] N. Chalhoub et S. J. Baker, « PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer », *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 4, n° 1, p. 127-150, févr. 2009, doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.
- [207] N. Faumont *et al.*, « c-Rel Is the Pivotal NF-κB Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study », *Front. Oncol.*, vol. 11, p. 638897, avr. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.638897.
- [208] G. Lenz et L. M. Staudt, « Aggressive Lymphomas », *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, n° 15, p. 1417-1429, avr. 2010, doi: 10.1056/NEJMra0807082.
- [209] G. Wright, B. Tan, A. Rosenwald, E. H. Hurt, A. Wiestner, et L. M. Staudt, « A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 17, p. 9991-9996, août 2003, doi: 10.1073/pnas.1732008100.
- [210] A. L. Shaffer *et al.*, « XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation », *Immunity*, vol. 21, n° 1, p. 81-93, juill. 2004, doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.010.
- [211] L. Pasqualucci *et al.*, « Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma », *J. Exp. Med.*, vol. 203, n° 2, p. 311-317, févr. 2006, doi: 10.1084/jem.20052204.
- [212] W. Tam, M. Gomez, A. Chadburn, J. W. Lee, W. C. Chan, et D. M. Knowles, « Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas », *Blood*, vol. 107, n° 10, p. 4090-4100, mai 2006, doi: 10.1182/blood-2005-09-3778.
- [213] A. L. Shaffer *et al.*, « Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program », *Immunity*, vol. 17, n° 1, p. 51-62, juill. 2002, doi: 10.1016/S1074-7613(02)00335-7.
- [214] for the Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP) *et al.*, « Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma », *Leukemia*, vol. 21, n° 11, p. 2332-2343, nov. 2007, doi: 10.1038/sj.leu.2404856.
- [215] C. Tunyaplin, A. L. Shaffer, C. D. Angelin-Duclos, X. Yu, L. M. Staudt, et K. L. Calame, « Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation », *J. Immunol.*, vol. 173, n° 2, p. 1158-1165, juill. 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1158.
- [216] H. Schmidlin *et al.*, « Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression », *Blood*, vol. 112, n° 5, p. 1804-1812, sept. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-01-136440.
- [217] H. Tagawa, « Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma », *Blood*, vol. 106, n° 5, p. 1770-1777, sept. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-02-0542.
- [218] S. Bea, « Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction », *Blood*, vol. 106, n° 9, p. 3183-3190, nov. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-04-1399.
- [219] E. Haralambieva *et al.*, « Genetic rearrangement of FOXP1 is predominantly detected in a subset of diffuse large B-cell lymphomas with extranodal presentation », *Leukemia*, vol. 20, n° 7, p. 1300-1303, juill. 2006, doi: 10.1038/sj.leu.2404244.
- [220] B. Streubel, U. Vinatzer, A. Lamprecht, M. Raderer, et A. Chott, « T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma », *Leukemia*, vol. 19, n° 4, p. 652-658, avr. 2005, doi: 10.1038/sj.leu.2403644.
- [221] R. E. Davis, K. D. Brown, U. Siebenlist, et L. M. Staudt, « Constitutive Nuclear Factor κB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells », *J. Exp. Med.*, vol. 194, n° 12, p. 1861-1874, déc. 2001, doi: 10.1084/jem.194.12.1861.
- [222] G. Lenz *et al.*, « Oncogenic *CARD11* Mutations in Human Diffuse Large B Cell Lymphoma », *Science*, vol. 319, n° 5870, p. 1676-1679, mars 2008, doi: 10.1126/science.1153629.
- [223] M. Compagno *et al.*, « Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-κB in diffuse large B-cell lymphoma », *Nature*, vol. 459, n° 7247, p. 717-721, juin 2009, doi: 10.1038/nature07968.
- [224] M. Kato *et al.*, « Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas », *Nature*, vol. 459, n° 7247, p. 712-716, juin 2009, doi: 10.1038/nature07969.
- [225] S. Poulain *et al.*, « Macroglobulinémie de Waldenström », *Rev. Médecine Interne*, vol. 31, n° 5, p. 385-394, mai 2010, doi: 10.1016/j.revmed.2009.07.016.
- [226] J. Waldenström, « Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia - a new syndrome? », *Acta Med. Scand.*, vol. 117, n° 3-4, p. 216-247, avr. 2009, doi: 10.1111/j.0954-6820.1944.tb03955.x.

- [227] J. J. Castillo, A. J. Olszewski, S. Kanan, K. Meid, Z. R. Hunter, et S. P. Treon, « Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenström macroglobulinaemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database », *Br. J. Haematol.*, vol. 169, n° 1, p. 81-89, avr. 2015, doi: 10.1111/bjh.13264.
- [228] J. Sekhar, K. Sanfilippo, Q. Zhang, K. Trinkaus, R. Vij, et D. Morgensztern, « Waldenström macroglobulinemia: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database review from 1988 to 2005 », *Leuk. Lymphoma*, vol. 53, n° 8, p. 1625-1626, août 2012, doi: 10.3109/10428194.2012.656103.
- [229] K. Tanigaki *et al.*, « Notch–RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells », *Nat. Immunol.*, vol. 3, n° 5, p. 443-450, mai 2002, doi: 10.1038/ni793.
- [230] A. J. Olszewski, S. P. Treon, et J. J. Castillo, « Evolution of Management and Outcomes in Waldenström Macroglobulinemia: A Population-Based Analysis », *The Oncologist*, vol. 21, n° 11, p. 1377-1386, nov. 2016, doi: 10.1634/theoncologist.2016-0126.
- [231] E. D. Remstein, C. A. Hanson, R. A. Kyle, J. M. Hodnefield, et P. J. Kurtin, « Despite apparent morphologic and immunophenotypic heterogeneity, Waldenström's macroglobulinemia is consistently composed of cells along a morphologic continuum of small lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes, and plasma cells », *Semin. Oncol.*, vol. 30, n° 2, p. 182-186, avr. 2003, doi: 10.1053/sonc.2003.50073.
- [232] D. D. Metcalfe, D. Baram, et Y. A. Mekori, « Mast cells », *Physiol. Rev.*, vol. 77, n° 4, p. 1033-1079, oct. 1997, doi: 10.1152/physrev.1997.77.4.1033.
- [233] G. Krishnaswamy, « The human mast cell: functions in physiology and disease », *Front. Biosci.*, vol. 6, n° 1, p. d1109, 2001, doi: 10.2741/krishnas.
- [234] Y. A. Mekori et D. D. Metcalfe, « Mast cell–T cell interactions », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 104, n° 3, p. 517-523, sept. 1999, doi: 10.1016/S0091-6749(99)70316-7.
- [235] O. Tournilhac *et al.*, « Mast cells in Waldenström's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling », *Ann. Oncol.*, vol. 17, n° 8, p. 1275-1282, août 2006, doi: 10.1093/annonc/mdl109.
- [236] J. F. San Miguel *et al.*, « Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia », *Semin. Oncol.*, vol. 30, n° 2, p. 187-195, avr. 2003, doi: 10.1053/sonc.2003.50074.
- [237] B. Paiva *et al.*, « The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia », *Blood*, vol. 125, n° 15, p. 2370-2380, avr. 2015, doi: 10.1182/blood-2014-09-602565.
- [238] B. Paiva *et al.*, « Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification », *Leukemia*, vol. 28, n° 1, p. 166-173, janv. 2014, doi: 10.1038/leu.2013.124.
- [239] M. Gayet *et al.*, « Flow cytometry detection of CD138 expression continuum between monotypic B and plasma cells is associated with both high IgM peak levels and MYD88 mutation and contributes to diagnosis of Waldenström macroglobulinemia », *Cytometry B Clin. Cytom.*, p. cyto.b.21995, févr. 2021, doi: 10.1002/cyto.b.21995.
- [240] R. G. Owen *et al.*, « Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia », *Semin. Oncol.*, vol. 30, n° 2, p. 110-115, avr. 2003, doi: 10.1053/sonc.2003.50082.
- [241] M. J. Roberts, A. Chadburn, S. Ma, E. Hyjek, et L. C. Peterson, « Nuclear Protein Dysregulation in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia », *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 139, n° 2, p. 210-219, févr. 2013, doi: 10.1309/AJCP0YGM8BLFYHJY.
- [242] W. J. Chng *et al.*, « Gene-expression profiling of Waldenström macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma », *Blood*, vol. 108, n° 8, p. 2755-2763, oct. 2006, doi: 10.1182/blood-2006-02-005488.
- [243] N. C. Gutiérrez *et al.*, « Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals », *Leukemia*, vol. 21, n° 3, p. 541-549, mars 2007, doi: 10.1038/sj.leu.2404520.
- [244] E. Hatjiharissi *et al.*, « Proteomic Analysis of Waldenström Macroglobulinemia », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 8, p. 3777-3784, avr. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3089.
- [245] R. A. Kyle *et al.*, « Progression in smoldering Waldenström macroglobulinemia: long-term results », *Blood*, vol. 119, n° 19, p. 4462-4466, mai 2012, doi: 10.1182/blood-2011-10-384768.

- [246] I. M. Ghobrial, M. A. Gertz, et R. Fonseca, « Waldenström macroglobulinaemia », *Lancet Oncol.*, vol. 4, n° 11, p. 679-685, nov. 2003, doi: 10.1016/S1470-2045(03)01246-4.
- [247] J. Koshiol, G. Gridley, E. A. Engels, M. L. McMaster, et O. Landgren, « Chronic Immune Stimulation and Subsequent Waldenström Macroglobulinemia », *Arch. Intern. Med.*, vol. 168, n° 17, p. 1903, sept. 2008, doi: 10.1001/archinternmed.2008.4.
- [248] C. M. Vajdic *et al.*, « Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström's Macroglobulinemia: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project », *JNCI Monogr.*, vol. 2014, n° 48, p. 87-97, août 2014, doi: 10.1093/jncimonographs/lgu002.
- [249] P. Saelee, A. Kearly, S. L. Nutt, et L. A. Garrett-Sinha, « Genome-Wide Identification of Target Genes for the Key B Cell Transcription Factor Ets1 », *Front. Immunol.*, vol. 8, avr. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00383.
- [250] P. Martin-Jimenez *et al.*, « Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance », *Haematologica*, vol. 92, n° 5, p. 635-642, mai 2007, doi: 10.3324/haematol.10755.
- [251] N. Gachard *et al.*, « IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas », *Leukemia*, vol. 27, n° 1, p. 183-189, janv. 2013, doi: 10.1038/leu.2012.257.
- [252] S. S. Sahota *et al.*, « Typical Waldenström macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events », *Blood*, vol. 100, n° 4, p. 1505-1507, août 2002.
- [253] J. Kriangkum, B. J. Taylor, T. Reiman, A. R. Belch, et L. M. Pilarski, « Origins of Waldenström's Macroglobulinemia: Does It Arise from an Unusual B-Cell Precursor? », *Clin. Lymphoma*, vol. 5, n° 4, p. 217-219, mars 2005, doi: 10.3816/CLM.2005.n.002.
- [254] L. Petrikos *et al.*, « Clonotypic Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Sequences in Patients with Waldenström's Macroglobulinemia: Correlation with MYD88 L265P Somatic Mutation Status, Clinical Features, and Outcome », *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 1-6, 2014, doi: 10.1155/2014/809103.
- [255] M. Varettoni *et al.*, « Clues to pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia and immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance provided by analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement and clustering of B-cell receptors », *Leuk. Lymphoma*, vol. 54, n° 11, p. 2485-2489, nov. 2013, doi: 10.3109/10428194.2013.779689.
- [256] P. Bonetti *et al.*, « Deregulation of ETS1 and FLI1 contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma », *Blood*, vol. 122, n° 13, p. 2233-2241, sept. 2013, doi: 10.1182/blood-2013-01-475772.
- [257] J. Kriangkum *et al.*, « Impaired class switch recombination (CSR) in Waldenström macroglobulinemia (WM) despite apparently normal CSR machinery », *Blood*, vol. 107, n° 7, p. 2920-2927, avr. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-09-3613.
- [258] G. Babbage *et al.*, « IgM-expressing Waldenström's macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo », *Leukemia*, vol. 21, n° 4, p. 827-830, avr. 2007, doi: 10.1038/sj.leu.2404538.
- [259] D. Roos-Weil *et al.*, « Identification of two DNA methylation subtypes of Waldenström's macroglobulinemia with plasma and memory B cell features », *Blood*, p. blood.2020005081, mai 2020, doi: 10.1182/blood.2020005081.
- [260] O. Landgren *et al.*, « Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study », *Blood*, vol. 113, n° 22, p. 5412-5417, mai 2009, doi: 10.1182/blood-2008-12-194241.
- [261] R. A. Kyle *et al.*, « Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance », *Blood*, vol. 102, n° 10, p. 3759-3764, nov. 2003, doi: 10.1182/blood-2003-03-0801.
- [262] H. Gregersen *et al.*, « Cancer risk in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance », *Am. J. Hematol.*, vol. 63, n° 1, p. 1-6, janv. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1096-8652(200001)63:1<1::AID-AJH1>3.0.CO;2-M.
- [263] M. L. McMaster et N. Caporaso, « Waldenström macroglobulinaemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance: emerging understanding of a potential precursor

- condition », *Br. J. Haematol.*, vol. 139, n° 5, p. 663-671, déc. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06845.x.
- [264] S. Y. Kristinsson, M. Björkholm, L. R. Goldin, M. L. McMaster, I. Turesson, et O. Landgren, « Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden », *Blood*, vol. 112, n° 8, p. 3052-3056, oct. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-06-162768.
- [265] A. Kaushal *et al.*, « Aberrant Extrafollicular B Cells, Immune Dysfunction, Myeloid Inflammation, and MyD88-Mutant Progenitors Precede Waldenström Macroglobulinemia », *Blood Cancer Discov.*, vol. 2, n° 6, p. 600-615, nov. 2021, doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0043.
- [266] Z. R. Hunter, G. Yang, L. Xu, X. Liu, J. J. Castillo, et S. P. Treon, « Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia », *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, n° 9, p. 994-1001, mars 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.71.0814.
- [267] S. P. Treon *et al.*, « Genomic Landscape of Waldenström Macroglobulinemia and Its Impact on Treatment Strategies », *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, n° 11, p. 1198-1208, avr. 2020, doi: 10.1200/JCO.19.02314.
- [268] C. Jiménez *et al.*, « From Waldenström's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation », *Blood Cancer J.*, vol. 7, n° 8, p. e591-e591, août 2017, doi: 10.1038/bcj.2017.72.
- [269] S. P. Treon *et al.*, « IBRUTINIB MONOTHERAPY PRODUCES LONG-TERM DISEASE CONTROL IN PREVIOUSLY TREATED WALDENSTROM'S MACROGLOBULINEMIA. FINAL REPORT OF THE PIVOTAL TRIAL (NCT01614821). », *Hematol. Oncol.*, vol. 37, p. 184-185, juin 2019, doi: 10.1002/hon.141_2629.
- [270] V. Leblond *et al.*, « Results of a Randomized Trial of Chlorambucil Versus Fludarabine for Patients With Untreated Waldenström Macroglobulinemia, Marginal Zone Lymphoma, or Lymphoplasmacytic Lymphoma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, n° 3, p. 301-307, janv. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.44.7920.
- [271] V. Leblond *et al.*, « Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia », *Blood*, vol. 128, n° 10, p. 1321-1328, sept. 2016, doi: 10.1182/blood-2016-04-711234.
- [272] J. Paludo *et al.*, « Bendamustine and rituximab (BR) versus dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide (DRC) in patients with Waldenström macroglobulinemia », *Ann. Hematol.*, vol. 97, n° 8, p. 1417-1425, août 2018, doi: 10.1007/s00277-018-3311-z.
- [273] M. S. Davids *et al.*, « Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, n° 8, p. 826-833, mars 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.70.4320.
- [274] S. P. Treon *et al.*, « Prospective, Multicenter Clinical Trial of Everolimus as Primary Therapy in Waldenström Macroglobulinemia (WMCTG 09-214) », *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, n° 10, p. 2400-2404, mai 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1918.
- [275] I. M. Ghobrial *et al.*, « Phase I/II trial of everolimus in combination with bortezomib and rituximab (RVR) in relapsed/refractory Waldenström macroglobulinemia », *Leukemia*, vol. 29, n° 12, p. 2338-2346, déc. 2015, doi: 10.1038/leu.2015.164.
- [276] S. P. Treon *et al.*, « Long-term outcomes to fludarabine and rituximab in Waldenström macroglobulinemia », *Blood*, vol. 113, n° 16, p. 3673-3678, avr. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-09-177329.
- [277] T. P. Giordano *et al.*, « Risk of Non-Hodgkin Lymphoma and Lymphoproliferative Precursor Diseases in US Veterans With Hepatitis C Virus », *JAMA*, vol. 297, n° 18, p. 2010, mai 2007, doi: 10.1001/jama.297.18.2010.
- [278] J. J. Castillo, S. Kanan, K. Meid, R. Manning, Z. R. Hunter, et S. P. Treon, « Rituximab intolerance in patients with Waldenström macroglobulinemia », *Br. J. Haematol.*, vol. 174, n° 4, p. 645-648, août 2016, doi: 10.1111/bjh.13794.
- [279] R. R. Furman *et al.*, « Once-weekly ofatumumab in untreated or relapsed Waldenström's macroglobulinemia: an open-label, single-arm, phase 2 study », *Lancet Haematol.*, vol. 4, n° 1, p. e24-e34, janv. 2017, doi: 10.1016/S2352-3026(16)30166-1.
- [280] Mouse Genome Sequencing Consortium, « Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome », *Nature*, vol. 420, n° 6915, p. 520-562, déc. 2002, doi: 10.1038/nature01262.

- [281] J. Q. Wang, B. Beutler, C. C. Goodnow, et K. Horikawa, « Inhibiting TLR9 and other UNC93B1-dependent TLRs paradoxically increases accumulation of MYD88L265P plasmablasts in vivo », *Blood*, vol. 128, n° 12, p. 1604-1608, sept. 2016, doi: 10.1182/blood-2016-03-708065.
- [282] G. Knittel *et al.*, « B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice », *Blood*, vol. 127, n° 22, p. 2732-2741, juin 2016, doi: 10.1182/blood-2015-11-684183.
- [283] T. Sewastianik *et al.*, « Human MYD88L265P is insufficient by itself to drive neoplastic transformation in mature mouse B cells », *Blood Adv.*, vol. 3, n° 21, p. 3360-3374, nov. 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000588.
- [284] K. Schmidt *et al.*, « B-Cell-Specific Myd88 L252P Expression Causes a Premalignant Gammopathy Resembling IgM MGUS », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 602868, déc. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.602868.
- [285] E. Ozcan, I. Rauter, L. Garibyan, S. R. Dillon, et R. S. Geha, « Toll-like receptor 9, transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor, and CD40 synergize in causing B-cell activation », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 128, n° 3, p. 601-609.e4, sept. 2011, doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.052.
- [286] C. Grandjette, A. Kennel, G. C. Faure, M. C. Bene, et P. Feugier, « Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells », *Haematologica*, vol. 92, n° 9, p. 1279-1281, sept. 2007, doi: 10.3324/haematol.10975.
- [287] P. Soriano, « Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain », *Nat. Genet.*, vol. 21, n° 1, p. 70-71, janv. 1999, doi: 10.1038/5007.
- [288] U. Sandhu *et al.*, « Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells », *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, n° 1, p. e1-e1, janv. 2011, doi: 10.1093/nar/gkq868.
- [289] P. Hohenstein, J. Slight, D. D. Ozdemir, S. F. Burn, R. Berry, et N. D. Hastie, « High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi », *PathoGenetics*, vol. 1, n° 1, p. 3, déc. 2008, doi: 10.1186/1755-8417-1-3.
- [290] O. Nyabi *et al.*, « Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells », *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, n° 7, p. e55-e55, avr. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp112.
- [291] J. H. Pope, M. K. Horne, et W. Scott, « Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus », *Int. J. Cancer*, vol. 3, n° 6, p. 857-866, nov. 1968, doi: 10.1002/ijc.2910030619.
- [292] H. A. Odelola et J. Koza, « Characterization of Nigerian strains of West Nile virus by plaque formation », *Acta Virol.*, vol. 19, n° 6, p. 489-492, nov. 1975.
- [293] G. W. Bornkamm, « Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system », *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, n° 16, p. e137-e137, sept. 2005, doi: 10.1093/nar/gni137.
- [294] G. Goormachtigh *et al.*, « Autoactivation of the Epstein-Barr Virus Oncogenic Protein LMP1 during Type II Latency through Opposite Roles of the NF- κ B and JNK Signaling Pathways », *J. Virol.*, vol. 80, n° 15, p. 7382-7393, août 2006, doi: 10.1128/JVI.02052-05.
- [295] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, et H. Bujard, « Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells », *Science*, vol. 268, n° 5218, p. 1766-1769, juin 1995, doi: 10.1126/science.7792603.
- [296] H. Rincón-Arévalo, C. C. Sanchez-Parra, D. Castaño, L. Yassin, et G. Vásquez, « Regulatory B Cells and Mechanisms », *Int. Rev. Immunol.*, p. 1-21, mars 2015, doi: 10.3109/08830185.2015.1015719.
- [297] C. Mauri et M. Menon, « The expanding family of regulatory B cells », *Int. Immunol.*, vol. 27, n° 10, p. 479-486, oct. 2015, doi: 10.1093/intimm/dxv038.
- [298] M. Franquesa *et al.*, « Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Abrogate Plasmablast Formation and Induce Regulatory B Cells Independently of T Helper Cells », *STEM CELLS*, vol. 33, n° 3, p. 880-891, mars 2015, doi: 10.1002/stem.1881.
- [299] P. A. Blair *et al.*, « CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients », *Immunity*, vol. 32, n° 1, p. 129-140, janv. 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.

- [300] S. Lemoine, A. Morva, P. Youinou, et C. Jamin, « Human T cells induce their own regulation through activation of B cells », *J. Autoimmun.*, vol. 36, n° 3-4, p. 228-238, mai 2011, doi: 10.1016/j.jaut.2011.01.005.
- [301] J. Q. Wang, Y. S. Jeelall, B. Beutler, K. Horikawa, et C. C. Goodnow, « Consequences of the recurrent MYD88L265P somatic mutation for B cell tolerance », *J. Exp. Med.*, vol. 211, n° 3, p. 413-426, mars 2014, doi: 10.1084/jem.20131424.
- [302] R. W. Logan *et al.*, « High-precision genetic mapping of behavioral traits in the diversity outbred mouse population », *Genes Brain Behav.*, vol. 12, n° 4, p. 424-437, juin 2013, doi: 10.1111/gbb.12029.
- [303] J. H. Nadeau, « Modifier genes in mice and humans », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 2, n° 3, p. 165-174, mars 2001, doi: 10.1038/35056009.
- [304] K. Al-Saktawi *et al.*, « Genetic background determines phenotypic severity of the Plp rumpshaker mutation », *J. Neurosci. Res.*, vol. 72, n° 1, p. 12-24, avr. 2003, doi: 10.1002/jnr.10561.
- [305] O. A. Iakoubova, H. Dushkin, et D. R. Beier, « Genetic Analysis of a Quantitative Trait in a Mouse Model of Polycystic Kidney Disease », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 156, n° 4, p. S72-S77, oct. 1997, doi: 10.1164/ajrccm.156.4.12-tac-0.
- [306] A. R. Moser, W. F. Dove, K. A. Roth, et J. I. Gordon, « The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. », *J. Cell Biol.*, vol. 116, n° 6, p. 1517-1526, mars 1992, doi: 10.1083/jcb.116.6.1517.
- [307] Z. R. Hunter *et al.*, « Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia », *Blood*, vol. 128, n° 6, p. 827-838, août 2016, doi: 10.1182/blood-2016-03-708263.
- [308] S. Okabe *et al.*, « Stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1 », *Blood*, vol. 105, n° 2, p. 474-480, janv. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-03-0843.
- [309] A. Perrot, J. Corre, et H. Avet-Loiseau, « Risk Stratification and Targets in Multiple Myeloma: From Genomics to the Bedside », *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, n° 38, p. 675-680, mai 2018, doi: 10.1200/EDBK_200879.
- [310] S. Poulain *et al.*, « Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia », *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, n° 6, p. 1480-1488, mars 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0646.
- [311] S. Jalali *et al.*, « Soluble PD-1 ligands regulate T-cell function in Waldenstrom macroglobulinemia », *Blood Adv.*, vol. 2, n° 15, p. 1985-1997, août 2018, doi: 10.1182/bloodadvances.2018021113.
- [312] M. A. Gertz, « Waldenström macroglobulinemia treatment algorithm 2018 », *Blood Cancer J.*, vol. 8, n° 4, p. 40, avr. 2018, doi: 10.1038/s41408-018-0076-5.

Résumé

Titre : Apport de la modélisation de la transformation du Lymphocyte B par MYD88 dans la compréhension de la Maladie de Waldenström.

Mots clés : Waldenström, MYD88, L265P, NF- κ B

La Maladie de Waldenström (MW), est un lymphome B indolent incurable. Ce lymphome, d'un point de vue plus général, se différencie des autres lymphomes indolents, par l'expansion d'un clone lymphoplasmocytaire de localisation médullaire quasi constante avec sécrétion d'une IgM monoclonale. On observe une différenciation lymphoplasmocytaire ainsi qu'une infiltration des cellules tumorales dans la moelle osseuse. Il est admis que ce lymphome est généralement précédé par une phase asymptomatique au cours de laquelle seule l'IgM monoclonale est détectée dans le sérum (MGUS IgM). La découverte récente de la mutation L265P de MYD88 activatrice de NF- κ B dans plus de 90% des cas a démontré que la MW est génétiquement distincte des autres lymphomes indolents avec sécrétion d'IgM.

MYD88 est une protéine adaptatrice impliquée dans l'immunité innée (action des TLR et des récepteurs à l'IL-1). Elle est impliquée dans l'inflammation qui favorise la cancérogénèse. Des mutations oncogéniques activatrices ont récemment été identifiées comme la mutation L265P. MYD88^{L265P} joue également un rôle intrinsèque dans la signalisation constitutive de la voie NF- κ B, en se liant via le domaine TIR des TLRs. Dans ce contexte il est apparu comme fondamental, compte tenu de l'implication de MYD88 muté dans la signalisation de cette voie, d'évaluer les conséquences de la surexpression de MYD88 muté *in vitro* ainsi que ces fonctions *in vivo* en termes de signalisation, d'inflammation et de transformation. Pour cela nous avons mené une étude *in vitro* à l'aide d'un modèle cellulaire EREB2.5 inducible à l'œstradiol. Cette lignée cellulaire a la particularité de pouvoir réprimer de façon réversible la voie NF- κ B en absence d'œstradiol. Il devient alors possible d'étudier spécifiquement l'effet de l'expression de la mutation MYD88 L265P sur les voies de signalisation situées en aval de la voie NF- κ B. Une étude *in vivo* a été menée sur un modèle des souris Knock-in dans lesquelles les allèles sauvages de MYD88 sont remplacés par des formes mutantes L265P de la protéine mutée. A l'aide de ce modèle nous avons pu démontrer que l'activation continue de MYD88 est capable de favoriser l'expansion précoce des cellules IgM lymphoplasmocytaire et des plasmocytes avec, d'abord, une hyper Ig polyclonale sérique puis un pic d'Ig monoclonale. Les pics d'Ig étaient constamment associés à des lymphomes à cellules B partageant des caractéristiques avec la MW. Ici, nous avons montré pour la première fois que la différenciation des lymphocytes B lymphoplasmocytaires IgM est au cœur du potentiel de transformation de MYD88L265P.

Title: Contribution of the modeling of the transformation of the B Lymphocyte by Myd88 in the understanding of Waldenström's disease.

Keywords: Waldenström, MyD88, L265P, NF- κ B

Waldenström's Disease (WM), is an indolent, incurable B lymphoma. This lymphoma, from a more general point of view, is differentiated from other indolent lymphomas by the expansion of a lymphoplasmacytic clone of almost constant bone marrow localization with secretion of monoclonal IgM. Lymphoplasmacytic differentiation is observed as well as infiltration of tumor cells into the bone marrow. It is accepted that this lymphoma is usually preceded by an asymptomatic phase in which only monoclonal IgM is detected in the serum (MGUS IgM). The recent discovery of the NF- κ B activating MYD88 L265P mutation in over 90% of cases demonstrated that WM is genetically distinct from other indolent lymphomas with IgM secretion. MYD88 is an adapter protein involved in innate immunity (action of TLRs and IL-1 receptors). It is involved in inflammation which promotes carcinogenesis. Recently, activating oncogenic mutations have been identified as the L265P mutation. MYD88 L265P also plays an intrinsic role in the constitutive signaling of the NF- κ B pathway, by binding via the TIR domain of TLRs. In this context it appeared to be fundamental, given the implication of mutated MYD88 in the signaling of this pathway, to evaluate the consequences of the overexpression of mutated MYD88 *in vitro* as well as these functions *in vivo* in terms of signaling, inflammation and transformation. For it, we performed an *in vitro* study using an estradiol-inducible EREB2.5 cell model. This cell line has the particularity of being able to reversibly repress the NF- κ B pathway in the absence of estradiol. It then becomes possible to specifically study the effect of the expression of the MYD88 L265P mutation on the signaling pathways located downstream of the NF- κ B pathway. An *in vivo* study was carried out on a knock-in mouse model in which the wild-type MYD88 alleles are replaced by mutant L265P forms of the mutated protein. Using this model, we were able to demonstrate that the continuous activation of MYD88 is able to promote the early expansion of lymphoplasmacytic IgM cells and plasma cells with, first, a serum polyclonal hyper Ig then an Ig peak. monoclonal. Ig peaks were consistently associated with B cell lymphomas sharing features with WM. Here, we have shown for the first time that the differentiation of IgM lymphoplasmacytic B