



Université de Limoges

ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

UMR CNRS 7276 INSERM1262 CRIBL Contrôle de la réponse immune B et lymphoproliférations, équipe Mécanismes de lymphomagenèse (2M2BC)

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Immunologie, Oncologie, Inflammation

Présentée et soutenue par
Léa PREVAUD

Le 21 décembre 2023

**Rôle de la sous-unité c-Rel NF- κ B dans le Lymphome B Diffus à
Grandes Cellules du Centre Germinatif (GCB-DLBCL) :
établissement d'un modèle murin pré-clinique**

Thèse dirigée par le docteur Nathalie Faumont (MCU, HDR) et le professeur Jean Feuillard (PUPH)

JURY :

Président du jury

M. Pinaud Eric, DR CNRS, UMR7276 CNRS INSERM 1062

Rapporteurs

M. Moreaux Jérôme, Professeur, Institut de Génétique Humaine UMR CNRS 9002

M. Bidere Nicolas, Directeur de recherche, CRCI2NA - INSERM U1307/CNRS 6075

Invités

Mme Faumont Nathalie, MCU, UMR7276 INSERM 1262 CRIBL



Tout le monde se trompe, le génie comme le demeuré, et ce n'est pas l'erreur qui est dangereuse mais le fanatisme de celui qui croit qu'il ne se trompe pas.

(Eric-Emmanuel Schmitt)

A mes grands-parents, paternels et maternels

Remerciements

Pour débiter, je souhaite commencer par dire merci à mes encadrants de thèse et à l'unité de recherche de m'avoir accueillie durant ces 4 années et m'avoir aidé à progresser chaque jour. Merci à Nathalie de m'avoir permis de travailler sur ce projet de thèse qui m'a beaucoup tenu à cœur et à grandir en tant que jeune scientifique.

Je remercie les membres de ma soutenance de thèse, E.Pinaud de présider mon jury de thèse et J.Moreaux et N.Bidere d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Nous allons procéder par ordre chronologique pour cette section, en espérant que je n'oublie personne. Tout d'abord merci à toi Julien qui m'a permis de réaliser mon premier stage de ce long cursus, j'ai beaucoup appris à tes côtés et tes conseils sont toujours appliqués aujourd'hui. J'exprime toute ma gratitude au professeur P.Berta qui m'a donné l'opportunité de rejoindre le master BIOTIN, véritable tremplin dans mon parcours, pour l'ambiance et la solidarité incroyable des étudiants, j'ai été très heureuse de faire partie de cette promotion. Petit détour par la Suède maintenant où je souhaite remercier le Pr. Ruzgas et le Dr.Jankovskaja pour leurs conseils, leur bienveillance et ce chaleureux accueil dans le laboratoire. Cette expérience a changé ma vision et ma façon d'entreprendre la recherche, toujours plus globale, transdisciplinaire et avec une curiosité sans fin. Merci pour les fikas, les party et tous ces superbes moments gravés dans ma mémoire. Merci à toi Eva qui lutte encore contre le cancer et qui m'a accueillie chez toi comme sa fille durant mon Erasmus en Scandinavie. Pour mon dernier stage de master, je souhaite remercier l'équipe RESIST@ML pour tous les enseignements et les conseils qui m'ont aidé à monter en compétences de labo en vue de la thèse et de l'obtention de mon concours.

Petit clin d'œil au COVID19 qui est venu perturber l'organisation de ma thèse mais qui m'a permis de faire des rencontres inoubliables 😊 Les JEDI, vous êtes géniaux je vous remercie pour votre bonne humeur et votre énergie dans la préparation de cette première édition (Issoufou, Arthur, Julie, Dylan, Stecy, Valentin, Cédric, Aurélien <3). Merci pour les moments associatifs passés ensemble à l'ADPLim.

Merci à l'ensemble de personnel de l'animalerie pour leur aide dans la gestion des modèles murins.

Si maintenant on passe par bureaux, je commence par le deuxième étage, merci ma Catherine pour TOUT, nos discussions, ta bonne humeur, nos apéros, tes concerts Gueules Sèches et ta gentillesse à toute épreuve <3. Je suis ravie d'avoir pu rencontrer ton petit loup avant mon départ belge. Je te souhaite le meilleur dans ta vie de famille et professionnelle ! Ma Roussine, tu as apporté de la joie en plus dans ce laboratoire. Ton sourire, ta bonne humeur et ton rire sont contagieux, merci pour ton aide lors des sessions souris <3 Je te souhaite une bonne poursuite de thèse et de profiter des bons moments à Limoges avec ton fils. Gemma, merci à toi pour ton rire et ton charme naturel 😊, j'ai adoré notre escapade à Madrid en Août par 40 degrés !! Merci Charlotte pour tous ces moments d'échanges, je suis contente pour toi que tu sois arrivée au bout de cette thèse et je te souhaite plein de bonnes choses en Allemagne. Je remercie également Morgane pour tous ses conseils et ces moments de remotivation quand le moral était bas, bonne continuation en post-doc. Eden, Nassab, Layla et Alex je vous ai connu sur le tard mais ce fut un plaisir de croiser votre chemin dans le laboratoire. Je vous souhaite de la réussite dans vos projets de recherches et plein de bonnes choses. Tiffany, sans toi je ne serais jamais JAMAIS arrivée au bout de cette thèse. Tu m'as vraiment guidée

et aidée dans les moments les plus compliqués pour moi et ce toujours avec bienveillance. Un très grand merci à toi et je te souhaite également le meilleur !! Claire merci pour ces nombreuses heures de discussion microscopie et cytométrie qui ont été bénéfiques. Là aussi ton sourire et ton sens de l'écoute sont et seront toujours très appréciés. Un grand merci à Christelle, Sandrine et Cendrine pour leur aide et leur soutien technique.

Un petit coucou désormais aux PhD de l'équipe JF : ma chère Dina la première que j'ai rencontré dans ce labo <3 Ne change pas, reste toi-même authentique et forte je pense beaucoup à toi et te souhaite le meilleur aux USA. Nader, bosseur et rêveur à la fois merci pour tout, nos cafés, nos échanges tes recettes, ta bonne humeur et ta résilience. J'ai été très contente d'avoir appris à te connaître au fil du temps et à apprécier nos échanges café et culture libanaise. Bonne route ! Les bébés maintenant, Kenza et Milène qui se rapprochent déjà de la soutenance. Les filles, vos personnalités pétillantes et votre sens de la fête font de vous de véritables vecteurs de bonne humeur <3 Tous ces moments passés ensemble, vos sourires et vos dingeries me manquent déjà hahahahaha ! On s'accroche pour finir la thèse les girls et je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite <3. Petit clin d'œil à Marine, Cassandra, Clarisse et Maëlle, merci pour vos beaux sourires et votre force GIRL POWER.

Merci maintenant à Sophie, Hussein et Robin pour leur guidance, leur bonne humeur et les super conseils protocoles et gestion du stress dont les doctorants sont si friands. Je tiens à remercier tout particulièrement Cathy pour TOUT, que ce soit pour les pannes de cyto mais aussi pour ton sens de l'écoute avisé. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et bénéficier de ton expérience. Merci également à Tan de m'avoir accueillie dans son département de Génie Biologique où j'ai absolument ADORE donner cours. Merci à Mme Verdier pour son professionnalisme et sa bonne humeur mon mandat de représentante des doctorants m'a beaucoup apporté et j'ai pris plaisir à siéger au conseil de l'ED 652.

Je souhaite remercier également Antoine et Pierre-Antoine qui ont réussi à me soutenir et me supporter sur ces 2 dernières années de thèse. Merci au groupe SGDF Sainte-Claire avec qui j'ai pu vivre de vrais moments d'échanges et de partage qui m'ont aidé à grandir en tant que jeune adulte. Un grand merci aux filles du cours de danse du Mercredi soir une vraie bouffée d'air frais. Je souhaite tout particulièrement remercier Amandine pour TOUT, ton écoute, ta douceur, tes mots et tes conseils précieux.

Je démarre maintenant un paragraphe de remerciements aux personnes sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, prête à soutenir. L.A.D.I.E.S <3 Quand je me dis que j'ai eu l'immense chance de vous avoir comme collègues et amies au quotidien Les filles, Stecy, Israa et Jennifer je n'ai même pas les mots <3 Vous avez toujours toujours été là, souriantes généreuses pleines de good vibes. Je vous dois ma thèse, sans vous j'aurais abandonné depuis longtemps. Vous aurez TOUJOURS une place particulière dans mon cœur et je suis heureuse de vous voir épanouies dans vos nouvelles vies. Vous ne méritez que le meilleur et je vous souhaite beaucoup beaucoup beaucoup de bonheur <3. Coucou Lucie, tu n'étais pas dans le même labo mais tu as la même place dans mon cœur. Tu es une mega bosseuse avec une personnalité incroyable. Toi aussi tu as participé à la réussite de cette thèse et je te souhaite le meilleur <3 (viens vite bosser en Belgique 😊).

Merci également à nos gentlemen Lilian et Quentin. Lilian pour tous tes conseils et ces supers apéros à la campagne, je te souhaite plein de bonnes choses dans les projets que tu entreprendras. Quentin, tu sais à quel point ton aide, tes blagues et ta bonne humeur en toute circonstance ont été vitales pour moi. J'ai ri, beaucoup ri et j'ai aussi beaucoup appris à tes

côtés, garde ta personnalité authentique et ta générosité sans limite. Toi aussi tu auras soutenu avant moi héhéhéhé donc je peux d'ores et déjà te souhaiter bonne route Docteur.

Merci à ma nouvelle équipe Belge qui a su m'accueillir dans les règles de l'art et qui m'apporte son soutien dans la dernière ligne droite.

Maintenant, je souhaite remercier mes connaissances proches et ma famille, pour leur soutien sans faille, leurs mots justes et leurs encouragements depuis toute petite. Je prends conscience en écrivant ces lignes que c'est l'aboutissement d'un long chemin. J'ai sacrifié beaucoup de moments en famille, avec vous pour étudier, changer d'université, partir en ERASMUS et ce avec vos soutiens malgré la distanciation physique. Merci pour vos encouragements dans les moments décisifs de mon parcours et encore aujourd'hui vous me montrez à quel point je suis chanceuse de vous avoir à mes côtés.

Merci à mon grand-père paternel et à Janeck pour qui j'ai une pensée spéciale et qui seront très heureux de me voir soutenir de là-haut.

Enfin, je souhaite remercier ma FAMILLE, le clan Prévaud toujours aussi soudé et résilient. Sans vous je n'aurais JAMAIS pu entreprendre ce long périple d'études. Papa, maman, Juju il est impossible de résumer en un paragraphe toutes les émotions qui se mélangent au moment d'écrire ces lignes. Je vous aime très fort, vous avez toujours été là pour moi et cette thèse je ne l'ai pas fait seule mais avec vous 3. Je ne me suis jamais sentie seule même lors de mes périodes loin de vous pour étudier. Aujourd'hui je suis fière de nous voir tous les 4 soudés et cette thèse, c'est notre réussite collective <3

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Table des matières

Remerciements.....	5
Droits d’auteurs.....	10
Table des matières.....	11
Table des illustrations.....	13
Table des tableaux.....	19
Abbréviations	20
Introduction.....	24

Chapitre 1 Immunité et voie de signalisation NF- κ B dans un contexte physiologique

I. Acteurs de la réponse immunitaire	26
I.1 Acteurs Moléculaires de la réponse immunitaire.....	26
I.1.1 Cellules T $\alpha\beta$ T et $\gamma\delta$ TCR.....	27
I.1.2 Mastocytes.....	31
I.1.3 Phagocytes.....	34
I.1.4 NK et NKT.....	37
I.1.5 Cellule B.....	39
II. Voie classique NF- κ B.....	58
II.1 Historique de la découverte de la voie NF- κ B.....	58
II.2 Sous-unités activatrices.....	58
II.2.1 Récepteurs impliqués	60
II.2.1.a Signalisation via le récepteur TNFR.....	60
II.2.1.b Signalisation via le récepteur des LT.....	60
II.2.1.c Signalisation via les récepteurs IL-1RI et TLR.....	61
II.2.2 Complexe IKK γ , IKK α et IKK β	61
II.2.2.a IKK α	63
II.2.2.b IKK β	63
II.2.2.c IKK γ	64
II.2.3 I κ B α	65
II.2.4 RelA ou P65.....	66
II.2.5 c-Rel	67
II.2.6 p50.....	72
III. Voie alternative NF- κ B.....	74

Chapitre 2 Développement B et voie NF- κ B

I.1 Développement médullaire.....	77
I.1.1 Cellule souche hématopoïétique	78
I.1.2 Stades pré pro-B et pre-B.....	83
I.1.3 Stade Pre-B	86
I.1.4 Stade B immature	88
I.2 Développement périphérique.....	89
I.2.a B transitionnels.....	86
I.2.b B naïfs	88
I.2.c Cellules plasmatiques à courte durée de vie.....	89
I.2.3 Développement périphérique dans le thymus.....	93
I.2.4 Développement périphérique dans le centre germinatif.....	94

I.2.4.1 Centroblastes.....	103
I.2.4.2 Centrocytes	105
I.2.4.3 B mémoires	107
I.2.4.4 Cellules plasmatisques à longue durée de vie	110

Chapitre 3 Activité aberrante de la voie NF-κB et anomalies du développement B

I.1 Lymphome Non Hodgkinien.....	113
I.1.1 Etiologie.....	113
I.1.2 Origine	114
I.1.3 Traitement.....	115
1.2 Lymphome B Diffus à Grandes Cellules	118
I.2.1 Généralités	118
I.2.2 Classification	118
I.2.3 Voies oncogéniques.....	120
I.2.4 Traitements..... ;	121
1.3 ABC-DLBCL.....	122
1.3.1 Généralités.....	122
1.3.2 Mutations oncogéniques.....	124
1.3.3 Traitements.....	126
1.4 GCB-DLBCL.....	128
1.4.1 Etiologie.....	128
1.4.2 Mutations oncogéniques.....	128
1.4.3 Traitements.....	132

Chapitre 4 Modèles d'étude de la lymphomagenèse B dépendants de NF-κB et cas de la sous-unité c-Rel dans le GCB-DLBCL

IV.1 Modèles <i>in vitro</i>	134
IV.2 Modèles <i>in vivo</i>	138
IV.2.1 Cas des ABC-DLBCL.....	142
IV.2.2 Cas des GCB-DLBCL.....	145
IV.3 Modèle de suractivation de NF-κB mimant un DLBCL.....	153

Table des illustrations

Figure 1. Molécules de surface responsables de la signalisation cellulaire impliquée dans la réponse immunitaire.....	26
Figure 2 Evènements majeurs de la différenciation cellulaire LT.....	28
Figure 3 Figure 3. Structures des récepteurs T l'αβT (A) et γδT chez l'Homme (B).....	30
Figure 4. Principaux mécanismes d'activation des cellules mastoïdienne, leurs réponses ainsi que leurs cibles thérapeutiques.....	32
Figure 5. Représentation des réponses cellulaires de la cellule mastoïdienne après son activation.....	33
Figure 6. Représentation schématique de la différenciation des cellules myeloïdes en conditions physiologiques.....	34
Figure 7. Représentation des fonctions effectrices des neutrophiles	37
Figure 8. Caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des cellules NK immatures (gauche) et matures (droite).....	38
Figure 9 Récepteurs des différentes populations de cellules NK32.....	39
Figure 10. Médiation humorale et cellulaire dans la réponse immune.....	41
Figure 11. Représentation schématique d'une Ig et de ses sous types IgG, IgA, IgD, IgE, IgA, IgM	42
Figure 12. Mécanisme de recombinaison VDJ.....	44
Figure 13. Mécanismes de l'épissage alternatif pour la co-expression d'IgM et d'IgD de surface	45
Figure 14. Représentation schématique du Pre BCR	46
Figure.15 Composition du Pré-BCR de la cellule B et des complexes BCR.....	47
Figure 16. Mécanisme de Recombinaison de Classe des Immunoglobulines	49
Figure. 17 Mécanisme d'hypermutation somatique (SHM).....	51
Figure 18. Schéma descriptif des Interactions entre lymphocytes B-cellules T.....	52
Figure 19. Voies de la signalisation au travers du BCR.....	53
Figure 20. Représentation de la voie de signalisation NF-κB, voie classique à gauche et voie alternative à droite (D'après Mirzaei, S et al 2021)	55
Figure 21 Récepteurs impliqués dans la voie canonique NFκB.....	56
Figure 22 Représentation schématique de IKKα, IKKβ et IKKγ et processus d'activation.....	58
Figure 23. Représentation schématique du complexe IKK de la voie canonique/classique NFκB (Adapté de Kennedy et al.2018).....	60
Figure 24. Structure et modifications post-transrationnelles de la protéine humaine Iκβα	61
Figure 25. Représentation schématique de la sous-unité RelA (p65) (D'après Perkins, N. D. 2012)	62

Figure 26. Représentation schématique de la sous-unité RE.....	63
Figure 27. Représentation schématique de l'homologue aviaire v-Rel et c-Rel ainsi que le pourcentage d'identité en composition d'acides aminés	64
Figure 28. Variants d'épissage du gène REL retrouvés dans des cellules de lymphomes humaines et lymphocytes primaires.....	65
Figure 29. Cellules cibles et fonctions de c-Rel.....	66
Figure 30. Représentation schématique de la sous-unité P50 NFκβ.....	68
Figure 31. Stimuli et fonctions de la voie classique/canonique NFκB dans la réponse immunitaire.....	69
Figure 32. Représentation schématique de la sous-unité RelB et p52 de la voie alternative/non canonique NFκβ	70
Figure 33. Fonctions de la voie alternatives non canoniques de NF-κβ en conditions physiologiques.....	71
Figure 34. Focus sur les Stades du développement médullaires.....	73
Figure 35. Différenciation myéloïde et lymphoïde à partir d'une cellule souche hématopoïétique.....	75
Figure 36 Voie NF-κB dans la différenciation hématopoïétique.....	77
Figure 37 Schéma des réarrangements DH-JH puis VH-DJH aux stades de différenciation pro B puis pre B.....	78
Figure 38 Conséquences de l'activation constitutive de NF-κB lors des stades précoces de développement B.....	79
Figure 39 Stades de différenciation précoces de la cellules B.....	80
Figure 40 Représentation schématique du Pre BCR (D'après Winkler, T. H., & Mårtensson, I. L. 2018).....	81
Figure 41 Représentation schématique de la différenciation B chez la souris.....	82
Figure 42 Elimination des cellules B auto réactives par le mécanisme de tolérance centrale	83
Figure 43 Développement B périphérique au niveau de la circulation sanguine (Adapté d'après Patel, A. M et al.2021).....	84
Figure 44 Acquisition de la mémoire des cellules B en 2 phases.....	87
Figure 45 Schéma récapitulatif des propriétés métaboliques et cellulaires des cellules sécrétrices d'anticorps.....	89
Figure 46 Structure et microenvironnement des Centres Germinatifs.....	91
Figure 47 Initiation des réactions du GC et formation d'un GC mature dans le ganglion lymphatique.....	93
Figure 48. Approche single cell pour l'étude des populations GCB.....	95
Figure 49 Représentation schématique de la structure dynamique du GC.....	96
Figure 50 Etapes de développement B au niveau du Centre Germinatif.....	98
Figure 51 Rôle des sous-unités NFκB dans l'initiation des centres germinatifs, la maintenance et la différenciation.....	99
Figure 52. Programme transcriptionnel du Centre Germinatif et stades de différenciation terminales post GC.....	101
Figure 53 Conséquences possibles d'une aberration de la voie NF-κB.....	103

Figure 54 Processus de différenciation du centrocyte en cellules plasmiques ou B mémoires.....	104
Figure 55. Rôles des cellules plasmiques à longue durée de vie et des B mémoires dans la réponse immune secondaire.....	106
Figure 56. Développement des cellules GCB et pathologies associées à une activité aberrante de NF- κ B.....	108
Figure 57 Incidence relative des catégories majeures de NHL (d'après les données de Smith, A et al. 2015) (D'après Al-Naeab, A. B., Ajithkumar, T., Behan, S., & Hodson, D. J. 2018).....	110
Figure 58. Mécanismes d'activation de la voie NF κ B dans les pathologies.....	113
Figure 59 Mécanismes oncogéniques et cibles thérapeutiques des différents sous-types de DLBCL.....	115
Figure 60 Voies de signalisation majeures altérées dans les DLBCL (D'après Shimkus, G., & Nonaka, T. 2023).....	116
Figure 61. Prise en charge thérapeutique des DLBCL (D'après Rojek, A. E., & Smith, S. M. 2022).....	117
Figure 62 Classification Immunohistochimique de la COO.....	119
Figure 63. Marquages Immuno histochimiques HES, CD10 et FOXP1 de tumeurs non GCB.....	119
Figure 64. Principaux évènements oncogéniques retrouvés dans le sous-type ABC-DLBCL.....	122
Figure 65. Origine cellulaire et lésions génétiques associées à chaque sous-types distincts de DLBCL.....	123
Figure 66. Courbe de survie ABC vs GCB généré à partir des données de la cohorte EpiSwitch DLBCL-CCS et Fluigdim	124
Figure 67 Coupes de ganglions lymphatiques de tissus GCB-DLBCL (A) et ABC-DLBCL (B) et marquages immuno-histochimiques associés.....	125
Figure 68. Représentation des coupes de tissus de patients atteints de DLBCL pour le marquage anti-c-Rel.....	127
Figure 69. Représentation schématique des DLBCL selon la cellule d'origine, la caractérisation par immunohistochimie, le profil d'expression génique et les analyses moléculaires.	128
Figure 70 Isolation et génération d'une lignée cellulaire dérivée de cellules de patient (créé avec Biorender d'après Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. 2022).....	130
Figure 71 Stratégies d'établissement de modèles murins transgéniques.....	136
Figure 72 Génération du KI BCL6 dans le modèle μ HABCL6	139
Figure 73 Construction de l'allèle conditionnel Myd88p.L252P.....	140
Figure 74 Modèles murins de délétion CREBBP.....	143
Figure 75 . Les lymphomes développés par les souris transgéniques CREBBP ont pour origine une cellule du GC.....	144
Figure 76. Stratégie de modèle murin mimant la perte de fonction CREBBP.....	145

Figure 77 Schéma de la construction KI de c-Rel dans le locus Basic BAC Transgénique150

Figure 78 Schéma **bilan des** conséquences **de la surexpression de c-Rel in vivo**.....151

Figure 79 Schéma récapitulatif de la dynamique c-Rel/BACH2 dans le GC.....249

Table des tableaux

Table 1. Familles d'Immunoglobulines et fonctions effectrices.....	50
Table 2. Mécanismes moléculaires de l'activation dérégulée de NF- κ B via la voie de signalisation classique ou alternative dans les sous-types distincts de lymphomes.....	112
Table 3. Inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation cellulaires responsables de la lymphomagenèse des DLBCLs (D'après Frick, M., Dörken, B., & Lenz, G. 2011).	129
Table 4. Lignées cellulaires utilisées comme modèles d'étude des DLBCL (d'après Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. 2022)	133
Table 5. Type de modèle murin, avantages et désavantages (d'après Kohnken, R., Porcu, P., & Mishra, A 2017).....	135
Table 6. Exemples de modèles murins de lymphomes.....	138
Table 7. Liste récapitulative des modèles murins de DLBCL couramment utilisés.	141

Abbreviations

A

ABC DLBCL : Activated Diffuse Large B Cell Lymphoma
AID: activation-induced cytidine deaminase
AITL: Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma
ALCL : Anaplastic Large Cell Lymphoma
APC: Antigen Presentating Cell
ATL: adult T-cell lymphoma/leukemia

B

BAC Bacterial Artificial Chromosome
BACH2 :B-cell tumour suppressor BTB and CNC homology 2
BCL10: Immune Signaling Adaptor
BCL6 B-cell Lymphoma 6
BCMA: B-cell mutation antigen
BCR: B Cell Receptor
BL: Burkitt Lymphoma
BLIMP1: B-lymphocyte-induced maturation protein 1

C

CARD11: Caspase Recruitment Domain family member 11
CCS: Chromosome Conformation Signature
CDKNA1 : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia
CLP : Common Lymphoid Progenitors
CMH: Complexe Majeur d’Histocompatibilité
COO: Cell Of Orgin
CPA : Cellules Présentatrices d’Antigène
CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTCL: Cutaneous T-cell lymphoma
HCS : Cellules souches hématopoïétiques

D

DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns
DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma

E

EBV: Epstein–Barr virus
ES Embryonic Stem Cell
ETP: Early Thymic Progenitors

F

FDC: follicular dendritic cells
FGF: Fibroblast Growth Factor
FL Follicular Lymphoma
FL: Follicular Lymphoma

G

GALT gut-associated lymphoid tissues
GC : Germinal Center
GCB DLBCL: Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma
GCB : Germinal Center B cells
GEMM: genetically Engineered Mouse Model
GEP: Gene Expression Profiling
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

H

HCV: Hepatitis C virus
HES: Hematoxylin & eosin
HL: Hodgkin Lymphoma
HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type 1

I

Ig : Immunoglobulines
IFN- γ : Interferon gamma
IL-1RI : Interleukin 1 receptor
IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase
IRES internal ribosomal entry site
IRF4: Interferon regulatory Factor 4
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITAMS: immunoreceptor-based activation motif

J

K

KI: Knock in
KO: Knock out
KSHV: Kaposi sarcoma-associated herpesvirus

L

LB : Lymphocyte B
LPS Bacterial Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T

M

MAFK : avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue K
MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MALT1: Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MCL : Mantle Cell Lymphoma
MDSCs : Myeloid Derived Suppressor Cell
MF: Mycosis Fungoides
mTORC1 mammalian target of rapamycin complex 1
MZL : Marginal Zone Lymphoma

N

NEMO: NF- κ B Essential Modulator
NHL : Non Hodgkin Lymphoma
NK : Natural Killer
NKT : Natural Killer T
NLS: Nuclear Localisation Signal
NOS: Not Otherwise Specified
NPC : Nuclear Pore Complex

O

P

PAMPS : Pathogen Associated Molecular Patterns
PAX5 paired box protein 5
PEL: Primary Effusion Lymphoma
PKC- θ : Protéine Kinase C θ
PMBL: Primary Mediastinal B Cell Lymphoma
PNA peanut-agglutinin
PTCL : Peripheral Mature Lymphomas
PTCL Peripheral T-cell lymphoma

Q

R

RAG : Recombination Activating Gene
RANK : receptor activator of NF- κ B
ROS : Reactive Oxygen Species

S

SCF SKP1-cullin-1-F-box-protein
SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disease
SCS: subcapsular sinus
shRNA: small hairpin RNA
SRBC Sheep Red Blood Cell
SS : Sezary Syndrome
SYK Spleen Tyrosine Kinase

T

TACI: calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TAK1: Transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase 1
TCR : T cell Receptor
TdT : désoxynucléotidyl transférase terminale
TGF β : (Transforming Growth Factor β)
TIRAP: TIR domain containing adaptor protein
TLR: Toll Like Receptor
TNFR1: (Tumor Necrosis Factor 1)
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TRADD, TNF-R-Associated Death Domain
TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

U

UNG: Uracil DNA Glycosylase

V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

W

WT wild type

X

XBP1 : X-box binding protein 1

Y

YFP Yellow Fluorescent Protein

Introduction

Préambule

Le système immunitaire chez l'Homme est défini comme l'ensemble des acteurs tissulaires, cellulaires et moléculaires responsables de la réponse immunitaire. Celle-ci va permettre à l'organisme de « prévenir les infections et d'éradiquer les infections déclarées » (*Abbas et Lichtman. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 2009*). Les rôles du système immunitaire sont variés et peuvent être impliqués dans la défense contre les infections, la défense contre les cellules tumorales mais également la défense contre les cellules ne portant pas les marqueurs du soi dans le cas d'un rejet de greffe par exemple. L'immunologie représente alors la branche de la recherche dédiée à l'étude de cette réponse immunitaire qui peut être divisée en deux types d'immunité : la première est l'immunité innée et la seconde l'immunité adaptative. L'immunité innée est responsable de la protection initiale, primaire et basique contre les infections tandis que l'immunité adaptative se développe de façon plus lente avec des mécanismes de défenses qui se mettent en place de plus tardivement cependant, c'est ce type de réponse qui s'avère plus précis et plus efficace contre les infections.

L'immunité innée a pour fonction primaire le recrutement des cellules immunes sur les sites d'infections et d'inflammations notamment par le biais de la production de cytokines. Les cytokines, regroupant également les chimiokines ou chemokines, sont des protéines sécrétées possédant des fonctions dans la croissance, la différenciation et l'activation cellulaire qui permettent de réguler et déterminer la nature de la réponse immunitaire et le contrôle précis du trafic des cellules ainsi que le réarrangement des organes immunitaires (*Borish, L. C., & Steinke, J. W. 2003*) Également appelés organes lymphoïdes, ils se décomposent en deux catégories, les organes lymphoïdes primaires dans lesquels les lymphocytes sont générés, se développent et mûrissent ; et les organes lymphoïdes secondaires où la rencontre entre les lymphocytes matures et l'antigène a lieu (*Cruse, J., Lewis, R., & Wang, H. 2004*). La production en quantité de ces cytokines permet la libération d'autres molécules comme les anticorps ainsi que des glycoprotéines permettant d'activer le complément. Le système complément est défini comme un composant thermolabile du plasma qui permet d'augmenter l'opsonisation afin de favoriser la phagocytose des bactéries et donnant la capacité aux anticorps de les tuer. Cette activité est qualifiée de complément car elle vient compléter l'activité antibactérienne des anticorps. L'activation du complément conduit ainsi à une cascade de signalisation dont les fonctions sont de reconnaître et opsoniser des antigènes les rendant vulnérables à la phagocytose, processus par lequel les cellules immunitaires sont capables d'ingérer les particules étrangères. L'immunité innée est la réponse immunitaire qui va permettre à l'organisme de se débarrasser des cellules mortes et des complexes d'anticorps formés et enlever toute substance étrangère présente dans les organes, les tissus, la circulation sanguine ou encore le système lymphatique. Cette réponse innée est également capable d'activer la réponse immunitaire adaptative par le biais du phénomène de présentation de l'antigène.

La réponse immunitaire adaptative requiert deux populations cellulaires : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes B vont servir à la production d'anticorps et les lymphocytes T vont permettre de recruter des lymphocytes T dits effecteurs tout en collaborant étroitement avec les lymphocytes B. Cette réponse se subdivise en deux sous-types : une réponse immunitaire dite humorale et réponse immunitaire dite cellulaire. La réponse immunitaire humorale est effectrice dans le cas d'une rencontre avec un microbe. Les

lymphocytes répondeurs sont les lymphocytes B et le mécanisme effecteur aboutit à la production d'anticorps sécrétés qui permettent de bloquer les infections et éliminer les microbes situés dans le milieu extra cellulaire. La réponse immunitaire cellulaire, quant à elle, s'applique aux microbes ayant subi la phagocytose et donc internalisés dans un macrophage mais également des microbes intracellulaires comme des virus qui ont la capacité de se répliquer une fois internalisés. Dans le premier cas, ce sont les lymphocytes T dit auxiliaires qui activeront les macrophages afin de tuer les microbes internalisés. Dans le second cas, les lymphocytes T dit cytotoxiques permettront de tuer la cellule infectée et éliminer les potentiels réservoirs d'infection. La réponse immunitaire adaptative se met en place dans les 5 jours suivant la rencontre avec l'agent pathogène. Ces deux types de réponses permettent ainsi une prise en charge complémentaire de l'élément pathogène à éliminer tout en permettant à l'organisme de se prémunir d'une seconde rencontre avec ce même agent.

Mon manuscrit de thèse s'intéresse à une des voies clés de régulation de la réponse immune, la voie NF- κ B. Dans un contexte physiologique, cette voie cruciale est impliquée à la fois dans l'immunité innée et adaptative. Elle participe également à la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules immunitaires. En revanche, nous verrons que sa dérégulation et son activation aberrante sont à l'origine de nombreuses pathologies et notamment des cancers du système immunitaire comme les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules, Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL).

Chapitre I. Immunité et voie de signalisation NF- κ B dans un contexte physiologique

I. Acteurs de la réponse immunitaire

I.1 Acteurs moléculaires et réponse immunitaire

Dans un contexte physiologique, la réponse immunitaire est rendue possible par un ensemble de cascades de signalisation cellulaire. En effet, l'ensemble des cellules de la réponse immune innée et adaptative a évolué au cours du temps dans un but bien précis : être capables d'exprimer à la surface des récepteurs ou ligands spécifiques afin de répondre au mieux aux signaux de l'environnement qui les entourent. Ces molécules de signalisation situées à la surface des cellules (Figure 1) représentent des atouts vitaux pour la différenciation, la reconnaissance et le bon fonctionnement cellulaire (Zhu, Y., Yao, S., & Chen, L. 2011). A travers ces récepteurs uniques capables de distinguer des signaux spécifiques, il est alors possible de répondre de façon régulée aux différents stimuli.

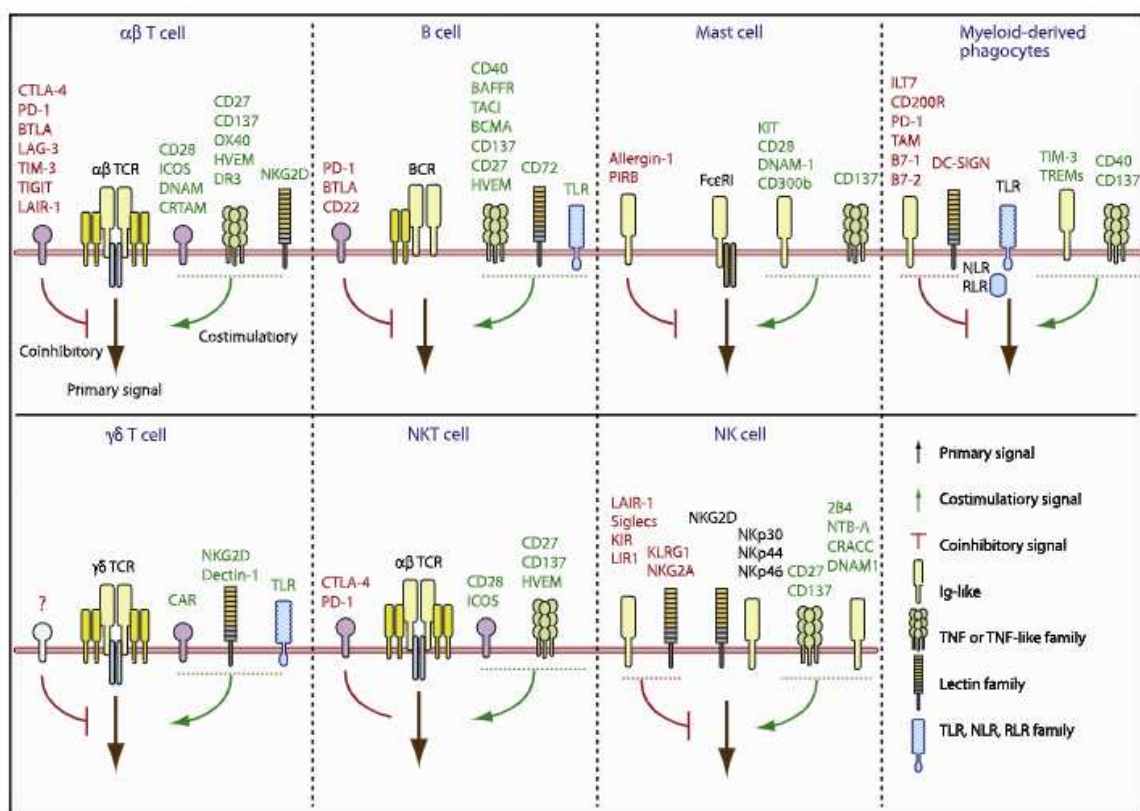


Figure 1. Molécules de surface responsables de la signalisation cellulaire impliquée dans la réponse immunitaire.

Les principaux signaux primaires ainsi que les co-signaux de stimulation ou d'inhibition sont représentés sur cette figure pour chaque sous type de cellules immunitaire. TLR= Toll-Like Receptor, RLR= RIG-Like Receptor et NLR NOD-Like Receptor. (Adaptée de Zhu, Y., Yao, S., & Chen, L. 2011)

Dans cette première partie nous allons développer les acteurs cellulaires majeurs de la réponse immunitaire et faire le lien avec l'une des voies clé responsable de la réponse immune, la voie de signalisation cellulaire NF- κ B.

Pour commencer, les deux types cellulaires requis pour la reconnaissance spécifique de l'antigène sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Ils représentent alors les seules cellules de l'organisme capables de reconnaître et de répondre de façon spécifique à chaque épitope antigénique. Un épitope, également appelé un déterminant antigénique, représente le site de l'antigène capable d'interagir avec le site de liaison « antigen-binding » de la région variable d'un anticorps, également appelée paratope. Cette fixation spécifique et précise entre l'épitope et le paratope est basée sur une interaction en 3 dimensions et une union non covalente. Cependant, l'épitope peut également interagir avec un récepteur cellulaire qui lui est spécifique. A noter qu'un antigène isolé peut avoir plusieurs épitopes différents disponibles pour réagir avec des anticorps ou des récepteurs de lymphocytes T (Cruse, J., Lewis, R., & Wang, H. (Eds.). (2004). *Immunology guidebook*. Elsevier). Un antigène représente alors un ensemble de molécules capables d'initier et stimuler une réponse immune. Chaque antigène a des caractéristiques particulières à sa surface induisant des réponses spécifiques et complexes.

Les cellules B ont la capacité de se différencier en plasmocytes afin de produire des anticorps pour neutraliser l'antigène, c'est ce que l'on appelle l'immunité humorale dépendante des cellules LB tandis que l'immunité dite cellulaire est médiée par les cellules LT.

Les LT et les LB sont dotées de récepteurs pour la reconnaissance de l'antigène respectivement le TCR récepteur des cellules T pour les LT et le BCR récepteur des cellules B, exhibant tous les deux des spécificités propres à leur surface. Les gènes codants pour ces structures subissent alors une série d'évènement de recombinaison au niveau de leur ADN permettant ainsi de leur conférer une large diversité phénotypique (Cano, R. L. E., & Lopera, H. D. E. (2013). *Introduction to T and B-lymphocytes*. In *Autoimmunity: from bench to bedside* [Internet]. El Rosario University Press.).

Nous allons donc décrire ici l'ensemble de ces molécules de surface impliquées dans les voies de signalisation cellulaire en lien avec la réponse immune et en particulier la voie de signalisation qui fait l'objet de mon travail de thèse, NF- κ B.

I.1.1 Cellules T $\alpha\beta$ T et $\gamma\delta$ TCR

Le système immunitaire des vertébrés est intimement lié aux lymphocytes T (LT) qui se développent dans le thymus. Celui-ci représente un organe lymphoïde primaire d'une importance majeure dans le développement de ce sous-type cellulaire. En effet, les LT en développement exprimant des récepteurs pouvant être à l'origine d'attaque immune contre les protéines de son propre organisme peuvent être éliminés dans cet organe. Ce processus porte le nom de tolérance centrale. (Benveniste, P. M., Roy et al. 2018).

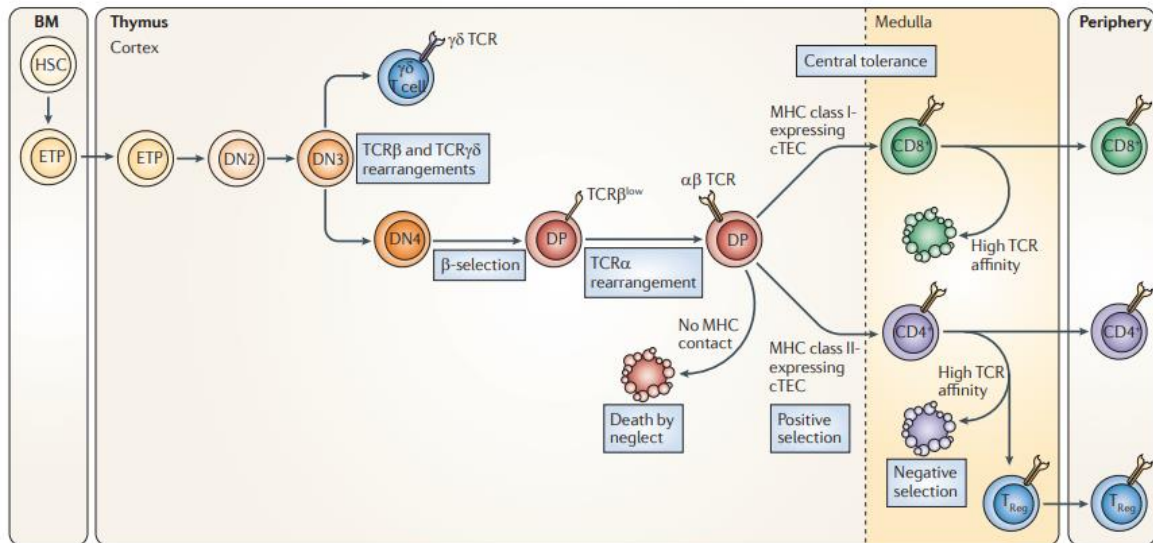


Figure 2. **Evènements majeurs de la différenciation cellulaire LT**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse donnent naissance aux progéniteurs thymiques précoces (ETP) possédant un potentiel de différenciation en cellules B et en cellules dendritiques (Gowans et al. 1962). Lorsque ce potentiel de différenciation est perdu, les ETP deviennent des cellules doubles négatives (DN) qui ne vont pas exprimer de récepteur des lymphocytes T ou les co-récepteurs CD4 et CD8. En revanche, elles vont subir des réarrangements majeurs des gènes du récepteur T. Le processus de sélection du gène TCR β induit la génération de cellules doubles positives exprimant une chaîne β TCR réarrangée TCR β ^{low} et les co récepteurs CD4 et CD8. S'en suit un réarrangement du locus de la chaîne α TCR et l'expression $\alpha\beta$ TCR (Boehmer, H. V. 1988 ; von Boehmer, H., & Fehling, H. J. 1997). S'il n'y a pas de contact avec les molécules du CMH alors il y a un processus de mort cellulaire. Dans le cas contraire, les cellules ayant la capacité d'entrer en contact avec le CMH-I conservent l'expression de CD8 et perdent celle de CD4 ; les cellules se liant au CMH-II conservent le CD4 et perdent le CD8. Ce processus est appelé sélection positive (Jameson, S. C., Hogquist, K. A., & Bevan, M. J. 1995). Si un seuil d'avidité de liaison au CMH est dépassé alors les cellules sont déléetées par sélection négative dans la moelle (Palmer, E. 2003). Certaines cellules thymiques CD4⁺ autoréactives ayant une avidité pour les molécules du CMH-II en dessous du seuil de sélection négative sont capables de réguler à la hausse le facteur de transcription Forkhead box P3 (FOXP3) et ce petit pourcentage de cellules exerce alors des fonctions cellulaires T régulatrices (Treg) Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. 2003). Le sous-type T $\gamma\delta$ dérivent de cellules double négatives n'ayant pas encore subi de sélection β (Hayes, S. M., Li, L., & Love, P. E. (2005). Il existe également d'autres thymocytes (non représentés sur ce schéma) double positif exprimant des RT auto-réactifs restreint, utilisant généralement le segment de gène variable V α 14. Leur sélection est positive sur les thymocytes CD1d⁺ double positifs et se différencient en cellules tueuses naturelles T (NKT) (Bendelac, A. et al. 1997). (D'après Miller, J. F. 2011)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) provenant de la moelle osseuse donnent naissance au progéniteurs précoces thymiques (ETP), qui possèdent encore la capacité à se différencier en cellules B et cellules dendritiques (Wu, L. et al. 1991). Lorsque les ETP perdent leur capacité à se différencier, ils deviennent des cellules double négative (DN) n'exprimant plus le récepteur T ni les co-récepteur CD4 et CD8. Débute alors le processus clé de

réarrangement des gènes du récepteur T (TCR). La sélection des gènes TCR β conduit à la génération de cellules double positive exprimant une chaîne réarrangée constituant la TCR β -chain (TCR β low) et à la fois les corécepteurs CD4 et CD8. Cet évènement est suivi par le réarrangement du locus de la chaîne α et de l'expression du récepteur T $\alpha\beta$ (*Boehmer, H. V. 1988*). Si un échec de contact avec les molécules du CMH a lieu, cela résulte par la mort des cellules. Celles dont le TCR se lie aux molécules du CMH de classe I conservent l'expression du CD8 et perdent celle du CD4 alors que les TCR dont les molécules se lient au CMH de classe II conservent le CD4 et perdent le CD8. Ce processus porte le nom de sélection positive (*Jameson, S et al. 1995*).

Pour rappel, le principe du modèle du soi et du non-soi selon Burnet (*Burnet S. F. M. 1949*) se résume ainsi : un organisme déclenche une réaction immunitaire contre une entité qui ne porte pas les marqueurs du soi donc reconnue comme le non-soi. A l'inverse l'organisme tolérera toute entité possédant les marqueurs du soi.

Ce modèle du soi a pu être appuyé par les nombreuses expériences de rejet/tolérance de greffe qui démontrent que l'animal ne développe quasiment jamais la capacité de réagir d'un point de vue immunologique à des tissus/cellules étrangères auxquels ils auront été préalablement suffisamment exposés dans leurs vies fœtales (*Re, B. 1953*). Concernant le phénomène de sélection négative, il est défini par le fait que la tolérance au soi se fait par élimination clonale plutôt que par suppression. De la même façon, cette induction à la tolérance du soi a lieu dans le thymus (*Kappler et al. 1987*). Le modèle du soi est alors qualifié de peptidique car il serait défini par un groupe de peptides ayant pour origine des protéines cellulaires et ces peptides seraient présentés aux lymphocytes T dans le contexte des molécules HLA (Human Leucocyte Antigen ou CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité) chez l'Homme ou H2 chez la souris (*Kourilsky et Claverie. 1988*), c'est-à-dire le système de reconnaissance du soi.

Si l'avidité de liaison aux ligands CMH-peptide dépasse un certain seuil, les cellules sont éliminées par sélection négative dans la moelle (*Palmer, E. 2003*).

Les LT peuvent être classifiés en deux sous types les $\alpha\beta$ LT et $\gamma\delta$ LT. Ces deux sous-types de LT vont alors exprimer différents récepteurs T à l'antigène ou TCR pour T cell Receptor comme l' $\alpha\beta$ TCR ou le $\gamma\delta$ TCR dont la composition inclue différents ensembles de chaînes TCR ayant subi des réarrangements somatiques ainsi que des sous-unités CD3 (Figure 3).

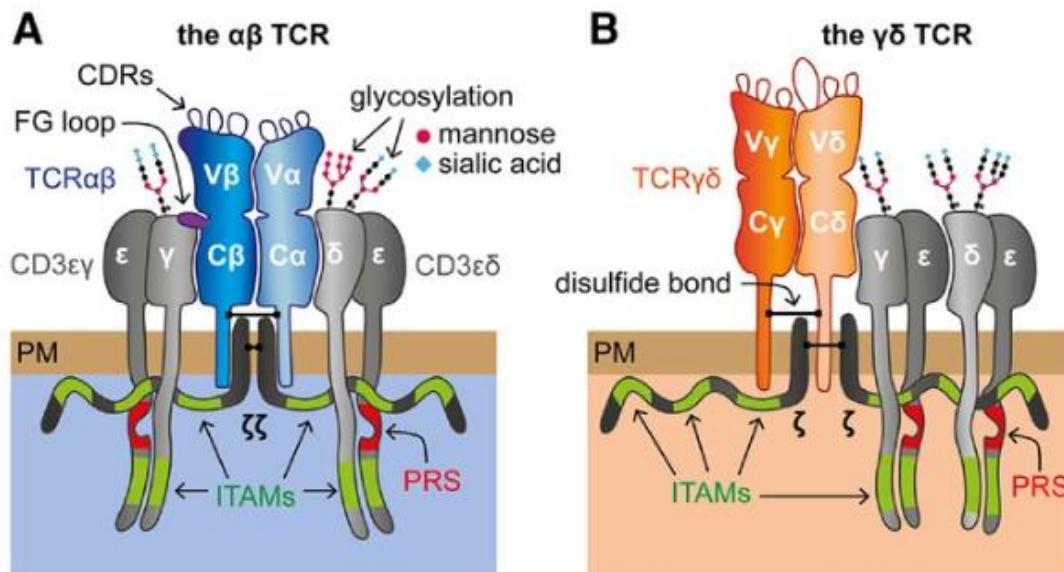


Figure 3. Structures des récepteurs T l' $\alpha\beta$ T (A) et $\gamma\delta$ T chez l'Homme (B)

Le récepteur T $\alpha\beta$ situé à gauche (A) de l'image possède un site de liaison à l'antigène composé de TCR- α /TCR- β (TCR $\alpha\beta$) en bleu et d'un complexe CD3 en gris. Le récepteur T $\alpha\beta$ est divisé en une région variable (V) avec les CDR formant ainsi le site de liaison à l'antigène et la région constante. La boucle FG dans le récepteur T β qui communique avec le CD3 est montrée en violet. Les motifs de glycosylation du CD3 ainsi que les motifs intra-cellulaires comme les ITAMs immunoreceptor-based activation motif en vert et les séquences riches en proline PRS proline rich sequence en rouge situées dans le CD3 ϵ sont indiqués sur ce schéma. (B) Le récepteur T $\gamma\delta$ T est composé d'un site de liaison à l'antigène TCR- γ /TCR- δ hétérodimère (TCR $\gamma\delta$) coloré en orange. Les sous-unités CD3 sont réarrangées différemment, la boucle FG est plus beaucoup plus courte, le pont dissulfure entre les sites de liaison du ligand sont placés différemment et les motifs de glycosylation du CD3 divergent de ceux du récepteur T $\alpha\beta$. L'abréviation PM représente la membrane plasmique (PM plasma membrane). (D'après Morath, A., & Schamel, W. W. 2020)

Le développement ainsi que les fonctions des cellules T $\alpha\beta$ dépendent alors de la capacité du récepteur T $\alpha\beta$ à reconnaître les peptides antigéniques présentés par les protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Dès la reconnaissance des peptides du complexe CMH, les cellules T $\alpha\beta$ se différencient en cellules effectrices pouvant alors exercer des fonctions cytotoxiques ou produire des cytokines dans le but d'activer les cellules de la réponse immunitaire innée ou les lymphocytes B. Ce phénomène permet alors de protéger l'organisme contre les invasions de pathogènes et les tumeurs (Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. 2018).

A l'inverse, il n'existe pas de mécanisme similaire pour le sous-type T $\gamma\delta$. En effet, le récepteur T $\gamma\delta$ est capable de reconnaître des composés de structures et de fonctions biologiques différentes comme les lipopeptides dérivés de microorganismes et les protéines du soi. Ces protéines du soi incluent les protéines associées au stress et les protéines non classiques (Vermijlen et al. 2018) ; (Vantourout, P., & Hayday, A. 2013) et classiques du CMH (Benveniste, P. M et al. 2018). A noter que la reconnaissance de l'antigène ainsi que les signaux de différenciation du sous-type T $\gamma\delta$ divergent de ceux des LT $\alpha\beta$.

Pour résumer, ces deux populations distinctes de LT diffèrent au niveau de la structure du récepteur, son agencement dans l'espace, les motifs de glycosylation, l'organisation de la membrane plasmique mais également l'accessibilité aux motifs localisés dans la queue intracellulaire du CD3. Ces différences reflètent alors les modes d'activation propres de ces récepteurs et la signalisation cellulaire qui en découle. Il a été montré que la mise en évidence des séquences riches en proline dans le CD3 ϵ a lieu pour tous les ligands des récepteurs T $\alpha\beta$ et est requis pour induire la signalisation spécifique de ces récepteurs. A l'inverse, cette même exposition des séquences riches en proline dans le CD3 ϵ n'est pas induite par les ligands du récepteur T $\gamma\delta$. La signalisation du récepteur T $\gamma\delta$ a donc lieu indépendamment de ces régions riches en proline du CD3 ϵ . En outre, ce phénomène peut être amplifié par des anticorps des anti-CD3 ϵ (Ab-induced enforcement of CD3 ϵ PRS exposure) (Morath et al. 2020).

I.1.2 Mastocytes

Les mastocytes possèdent des fonctions importantes pour le bon fonctionnement du système immunitaire et sont originaires de la lignée hématopoïétique et plus précisément d'une cellule pro génitrice pluripotente de la moelle osseuse. Leur maturation est rendue possible par l'influence du ligand c-kit et des facteurs de cellules souches en présence de nombreux autres facteurs de croissance. Ces facteurs sont amenés par le microenvironnement du tissu où les mastocytes se destinent à résider. Cela inclut les tissus suivants : tissus de la muqueuse et épithéliaux ; cavité péritonéale et thoracique ; tissus vascularisés à l'exception des tissus du système nerveux central et de la rétine (da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. 2014). En conditions normales, les mastocytes matures ne se retrouvent pas dans la circulation sanguine. Cependant leurs progéniteurs sont capables de migrer vers les tissus et se différencier en mastocytes par l'intermédiaire de facteurs et cytokines spécifiques. Ils sont présents à travers l'ensemble de l'organisme et jouent un rôle important dans la maintenance de nombreuses fonctions physiologiques mais également impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies (Krystal-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. 2016).

Le mécanisme clé de l'activation des mastocytes est la réaction allergique médiée par l'IgE par le biais des récepteurs Fc ϵ RI. Les IgE sont produites par les cellules B matures en réponse à une interaction avec les cellules CD4 $^{+}$ Th2. Les cellules B matures naïves sont capables de produire des IgM et des IgD. Lorsqu'elles deviennent activées par un antigène, les cellules B vont proliférer. Or, si ces cellules interagissent avec des cytokines comme IL-4 (modulée elle-même par les cellules CD4 $^{+}$ Th2), un switch de classe d'une IgM vers une IgE se produit (Hofmann AM, Abraham SN 2009).

Les IgE sont majoritairement retrouvées liées au récepteurs Fc ϵ RI des mastocytes et peu d'IgE se retrouvent sous forme d'un anticorps soluble dans la circulation. Lorsque l'antigène entre en contact avec le mastocyte, il se lie à deux ou plus de molécules du Fc ϵ RI et active le relargage de granules par les mastocytes (Siraganian, R. P. 2003). Les IgE sont retrouvées au niveau des tissus conjonctifs sous les couches des tissus épithéliaux de la peau dans le tractus respiratoire mais également dans le tractus gastrointestinal (da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. 2014). En plus des récepteurs Fc ϵ RI, les mastocytes possèdent également des Fc récepteurs pour l'IgA et l'IgG, des récepteurs à l'adénosine, C3a, chimiokines, cytokines et aux motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) mais également des TLR (toll-like receptors). Ensemble, ils sont responsables de l'activation du mastocyte ainsi que de la réponse immune (Figure 4). La voie

cellulaire le plus communément associée à l'activation du mastocyte est l'activation via antigène/IgE/ FcεRI.

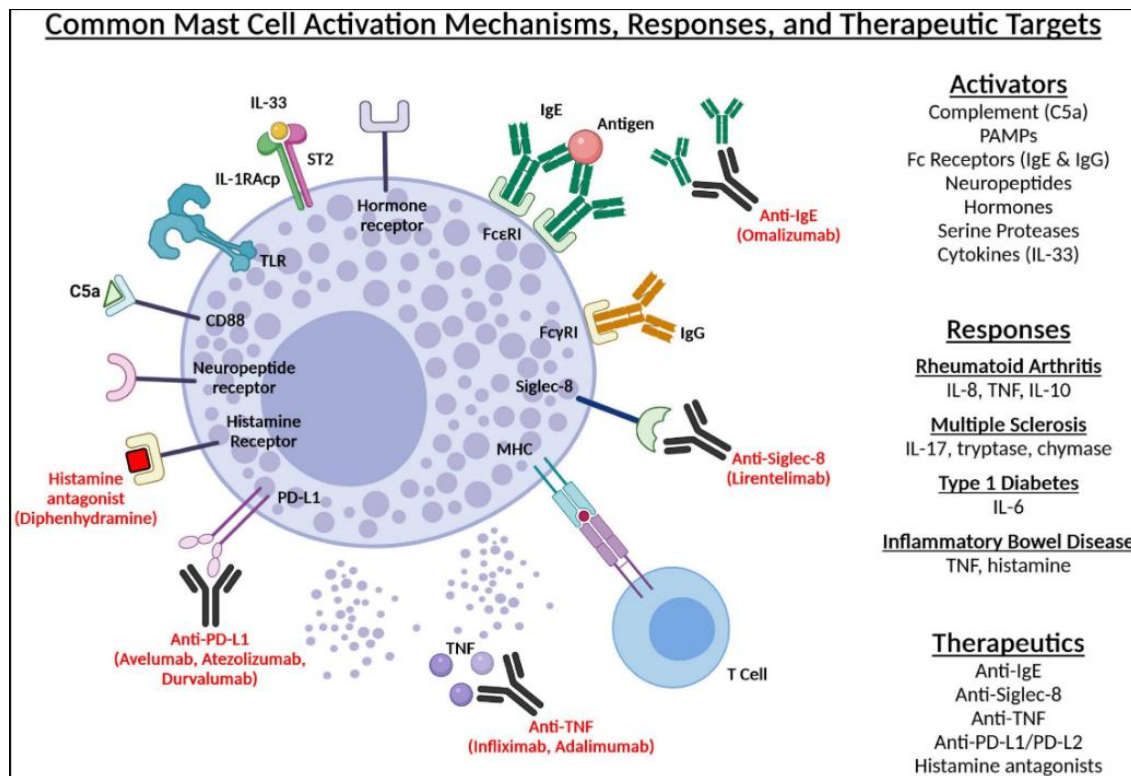


Figure 4. Principaux mécanismes d'activation des cellules mastoïdienne, leurs réponses ainsi que leurs cibles thérapeutiques

Sur cette figure sont représentées les différentes voies d'activation des cellules mastoïdiennes, leurs réponses spécifiques, les maladies auto-immunes associées à ce sous type-cellulaire ainsi que leurs cibles thérapeutiques. Les cellules mastoïdiennes peuvent être activées via les TLRs, les anaphylotoxines du complément, les récepteurs Fc (FcεR et FcγR), des neuropeptides, des hormones et des cytokines. L'une des pathologies en lien avec les cellules mastoïdiennes est la polyarthrite rhumatoïde, définie comme une maladie chronique inflammatoire auto-immune affectant les articulations et associée à la production accrue d'auto-anticorps ciblant diverses molécules dont des épitopes du soi modifiés (McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. 2010). L'activation des cellules mastoïdiennes médiée par l'IL-33 augmente l'IL-8, le TNF et la production d'IL-10. L'augmentation de l'IL-17, de la tryptase et de la chymase ont été observées dans le cerveau de patients atteints de sclérose multiple. La libération d'IL-6 par les cellules mastoïdiennes activées dans le pancréas va favoriser la différenciation des cellules T vers un phénotype Th17 associé au diabète de type 1. Enfin, les cellules mastoïdiennes TNF positives, et l'augmentation de l'histamine ainsi que ses métabolites sont quant à eux observés chez les patients avec une maladie inflammatoire de la vessie. Sur cette figure, les différents agents thérapeutiques ainsi que leurs actions sont indiqués en rouge. (D'après Noto et al.2021).

Les mastocytes sont donc impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la vasodilatation, l'angiogenèse et l'élimination des bactéries ainsi que des parasites. En plus de cela, ils jouent un rôle dans la régulation spécifique de certains types cellulaires comme les cellules dendritiques, les macrophages, les LT, les LB, les fibroblastes, les éosinophiles, les cellules endothéliales et épithéliales. Les mastocytes sont capables de générer et libérer de

multiples molécules multifonctionnelles comme l'histamine, les protéases, des prostanoïdes, des leucotriènes, de l'héparine ainsi que de nombreuses cytokines ; chimiokines et facteurs de croissance. Elles régulent ainsi de nombreuses fonctions dans des organes et tissus variés. L'une des fonctions phare des cellules mastoïdiennes est son rôle dans l'homéostasie des vaisseaux et des bronches. Elles peuvent également jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la croissance des os, le remodelage et l'homéostasie minérale. Il a été montré dans une revue (Norrby K. 2002) que les mastocytes sont impliqués dans l'amplification du phénomène d'angiogenèse car elles ont des propriétés sécrétrices de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), TGF-beta (Transforming Growth Factor), TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor alpha) et l'IL-8. Par ailleurs, les mastocytes sont également capables de libérer des protéases et de l'héparine qui à leur tour vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques capables de se lier à l'héparine. La libération d'histamine par les mastocytes induit une perméabilité des microvaisseaux entraînant là aussi une angiogenèse. Dans un contexte pathologique, ce processus d'angiogenèse exacerbé peut se produire en faveur de la croissance d'une tumeur. Les mastocytes constituent donc une première ligne de défense efficace contre les antigènes pouvant pénétrer dans le corps dû à leurs localisations principalement situées dans les tissus et les muqueuses (Bulfone-Paus S et al.2015). Une autre étude montre que leur présence est primordiale afin de garantir l'homéostasie des bactéries de la flore commensale au niveau du tractus digestif (Goto Y et al.2015). Dû à son exposition constante aux différents antigènes comme les bactéries (commensales et pathologiques) et les antigènes alimentaires, l'épithélium du système digestif confère une barrière protectrice contre ces menaces. Dans ce cas de figure, les mastocytes sont importants pour la différenciation des cellules T folliculaires « helper » via un signal ATP dépendant résultant à une fonction de maturation des IgA et de façon générale dans l'homéostasie des bactéries du système digestif (Goto Y et al.2015)

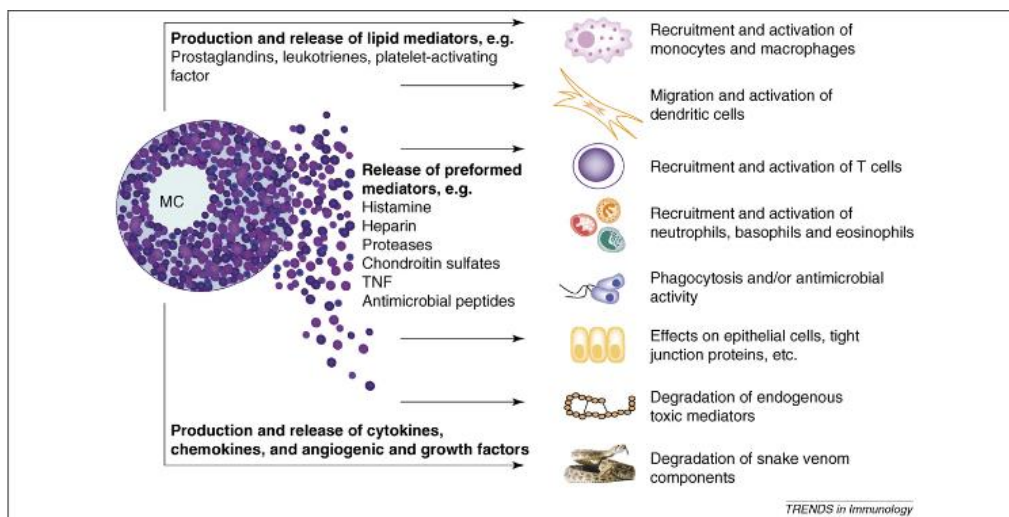


Figure 5. Représentation des réponses cellulaires de la cellule mastoïdienne après son activation

Les cellules mastoïdiennes sont activées afin d'assurer la synthèse et/ou la libération de molécules néo synthétisées. La sécrétion de ces produits a des effets variés et spécifiques à certains types cellulaires, mais également sur des pathogènes ainsi que des endo et exo peptides conduisant à une amélioration de la réponse immunitaire innée et adaptative (D'après Metz, M., & Maurer, M. 2007)

I.1.3 Phagocytes

Les phagocytes du système immunitaire incluent un grand nombre de sous populations dérivées de la lignée myéloïde regroupant les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Figure 6). Ces populations cellulaires sont hétérogènes à la fois sur le plan phénotypique mais également sur le plan fonctionnel (Roussel, M., Bartkowiak, T., & Irish, J. M. 2019).

Les MDSC sont impliquées dans la réponse immune dans certaines conditions pathologiques et sont souvent associées à un mauvais pronostic dans le cancer (Veglia, F et al. 2021). Les MDSC sont divisées en 2 catégories cellulaires différentes chez l'Homme et chez la souris. Premièrement, les granulocytiques/polymorphonulaires MDSC (granulocytic/polymorphonuclear MDSCs PMN-MDSCs) et ensuite les monocytiques MDSCs (M-MDSCs) classées selon leurs origines. On parle alors de la lignée granulocytique ou bien de lignée monocytique (Bronte, V et al.2016).

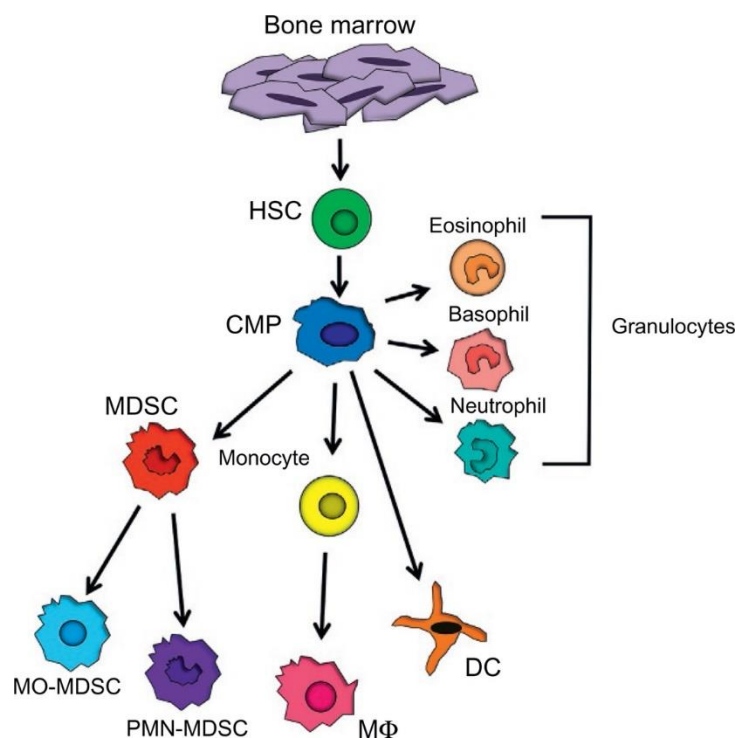


Figure 6. Représentation schématique de la différenciation des cellules myéloïdes en conditions physiologiques

Les cellules myéloïdes sont issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (HSCs hematopoietic stem cell en vert) qui vont se différencier en progéniteur commun myéloïde (CMPs common myeloid progenitors en bleu). En conditions physiologiques de myélopoïèse, les CMPs se différencient en granulocytes comme les éosinophiles, les basophiles, les neutrophiles mais également les monocytes (jaune), macrophages (rose) et cellules dendritiques (orange). Les MDSC se différencient à partir des CMP et sont regroupés en deux catégories les MO-MDSCs (bleu clair) ou les PMN-MDSC (violet). Correspondance des abréviations suivantes sur le schéma : HSC, hematopoietic stem cell; CMP, common myeloid progenitor; DC, dendritic cell; M Φ , macrophage; MO-MDSCs, monocytic myeloid-derived suppressor cells; PMN-MDSCs, polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells. (Modifié d'après Parker, K. Het al. 2015)

Dans la littérature, il a été proposé le concept suivant : un état pathologique d'activation de la réponse immunitaire est un phénomène associé à l'émergence des cellules de type MDSCs (Veglia, F et al. 2018). La voie d'activation classique de ces cellules repose sur une réponse aux pathogènes et l'endommagement des tissus. Cela est particulièrement médié par des motifs moléculaires spécifiques appelés DAMPS pour « danger-associated molecular patterns » ; les PAMPs et l'activation des TLR. Cela va conduire au recrutement et à la mobilisation rapide des neutrophiles et des monocytes depuis la moelle osseuse et se manifeste par l'activation de différents mécanismes cellulaires. Le premier est le phénomène de phagocytose défini comme le processus par lequel un phagocyte, majoritairement représenté par les monocytes et les neutrophiles (Laskin, D. L., Gardner, C. R., & Laskin, J. D. 2010), a la capacité d'entourer et de détruire des substances étrangères, comme les bactéries, et éliminer les cellules mortes. Les deux derniers mécanismes sont la dégranulation et la formation du piège extracellulaire des neutrophiles (NET neutrophil extracellular trap) (Figure 7).

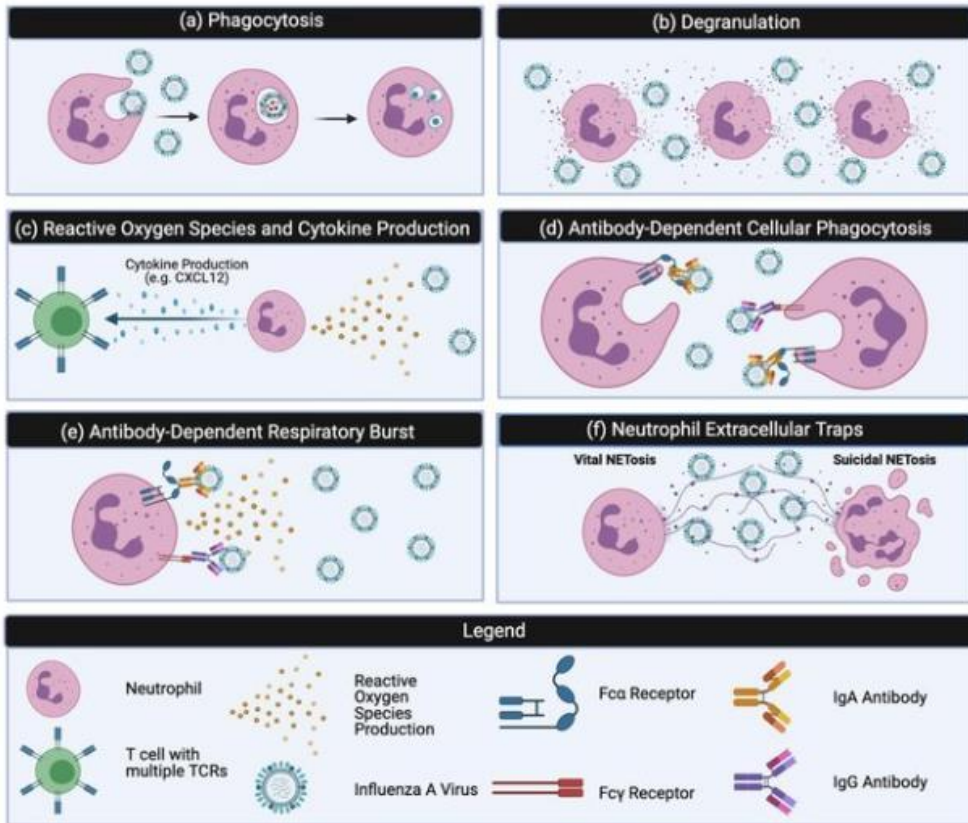


Figure 7. Représentation des fonctions effectrices des neutrophiles

(a) La phagocytose est un processus complexe impliquant l'internalisation puis l'élimination finale des agents pathogènes après formation du phagosome qui correspond à une vésicule qui se forme par invagination de la membrane plasmique avec ses lipides et protéines associés lors de la phagocytose de microbes ou de protéines microbiennes. (Eley, B. S., & Beatty, D. W. 2009) (b) La dégranulation constitue le mécanisme par lequel s'effectue la libération de granules internes contenant des enzymes et des produits chimiques cytotoxiques de manière contrôlée lors de l'inflammation ou de la reconnaissance d'agents pathogènes. (c) Oxydative burst, le complexe NADPH oxydase est responsable de la génération d'espèces réactives de l'oxygène ROS pouvant être libérées dans le milieu intra ou extra cellulaire. Les cytokines elles, sont constituées de petites protéines sécrétées qui ont un effet spécifique sur la communication et l'interaction cellule-cellule. (d) La phagocytose dépendante de l'anticorps a lieu dans le cas d'une interaction spécifique antigène/ Fc-FcR résultant en un mécanisme d'internalisation. (e) Le burst oxydatif dépendant de l'anticorps a lieu après une interaction spécifique antigène/Fc-FcR aux complexes immuns entraînant une production de ROS. (f) Le phénomène de NET Neutrophil extracellular traps est médié par la libération de fibres d'ADN dans le milieu extra-cellulaire causée par la décondensation de la chromatine dans le but de lier puis d'immobiliser des pathogènes. Le mécanisme de Nétose suicide Suicidal NETosis conduit à la mort cellulaire alors que la nétose vitale vital NETosis, la membrane externe reste intacte permettant aux neutrophiles de continuer d'assurer son bon fonctionnement. (Adapté de George, S et al. 2021)

A l'inverse, l'activation pathologique des MDSCs est liée à une stimulation continue du compartiment cellulaire myéloïde en raison de la présence prolongée de facteurs de croissance myéloïdes et de signaux inflammatoires dans les contextes particuliers de cancer, d'infections ou d'inflammations chroniques et de maladies auto-immunes (*Veglia et al.2021*)

Pour résumer, les MDSCs ont des propriétés cellulaires clés dans le but d'inhiber les réponses immunes notamment celles médiées par les LT, les LB et les Natural Killer (NK). Les deux sous-types MO-MDSCS et les PMN-MSCs ont en commun des fonctions biochimiques capables d'arrêter la réponse immunitaire, en particulier la surexpression du signal STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), l'induction du stress du réticulum endoplasmique et l'expression de l'arginase 1 et l'expression de 100A8/A9 (marqueur macrophagique). Pour finir, leurs caractéristiques uniques les rendent également incapables dans certaines situations d'assurer une bonne régulation de la réponse immune (*Veglia et al.2021*)

I.1.4 NK et NKT

Les cellules Natural Killer (NK) constitue un groupe de population de lymphocytes innés et voués à jouer un rôle important dans la défense contre les infections et les cellules cancéreuses. Les NK sont à l'origine de l'initiation de la réponse immune contre les cellules infectées par des virus et les tumeurs. Elles représentent donc la première source de production de cytokines TNF- α , GM-CSF, et IFN- γ (*Ahmadi, A et al. 2022*). On distingue deux stades de maturation parmi les NK basés sur l'expression spécifique du CD27 et du CD11b. Les 3 grandes sous-populations de NK sont donc : les cellules NK immatures (CD27+CD11b-), les cellules NK intermédiaires (CD27+CD11b+), les cellules NK terminales matures (CD27-CD11b+) (*Hayakawa, Y., & Smyth, M. J. 2006*) (Figure 8). Les cellules NK possèdent alors une activité cytolytique conséquente dans le but de tuer de manière ciblée une cellule et simultanément sécréter diverses cytokines inflammatoires de type IFN- γ , TNF- α , et GM-CSF, mais aussi des chimiokines CCL3 et CCL5 (*Freud, A. G et al. 2017*). L'activation des cellules NK dépend de la balance entre signaux inhibiteurs et activateurs au niveau des récepteurs. Les signaux en faveur d'une activation des cellules NK regroupent le NKp30, NKp44 et NKp46, c-type lectin (NKG2D), Fc receptor (CD16), et les récepteurs de cellules killer (killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)). A l'inverse les signaux inhibiteurs vont être médiés par des récepteurs comme le CD94/NKG2A/B, KIR2DL et KIR3DL (*Freud et al.2017 ; Pende et al.2019*).

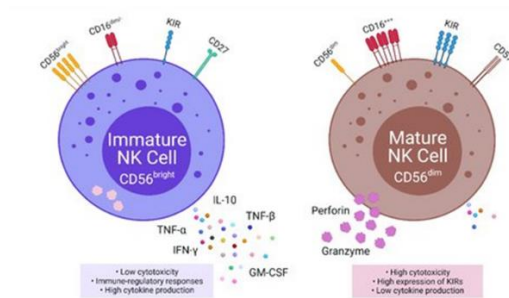


Figure 8. Caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des cellules NK immatures (gauche) et matures (droite)

Caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des cellules NK immatures (gauche) et matures (droite). Les NK immatures expriment CD56, possèdent ou non le marqueur CD16, sont faibles en KIR et CD27 et sont également connues sous le nom de NK régulatrices. Ces cellules ont une faible cytotoxicité mais une production accrue de cytokines. Les cellules NK matures sont CD56 positives mais de façon moins importante que les immatures, CD16 élevée, KIR forte et CD27 positives. Elles portent également le nom de NK cytotoxiques qui exhibent donc de fortes propriétés cytotoxiques et une faible production de cytokines. (D'après Heipertz et al.2021)

Concernant les cellules NKT ou Natural killer T (NKT) cells, elles représentent un sous type spécifique de cellules LT capables de reconnaître des motifs glycolipidiques d'antigènes en présence du marqueur CD1d, une molécule appartenant au CMH de classe I (Bendelac, A et al.2007 ; Godfrey, D et al.2010 ; Kronenberg, M., & Gapin, L. 2002). Les cellules NKT ont la capacité de médier de fortes réponses anti-tumorales et représentent ainsi une cible de choix dans les immunothérapies contre le cancer. Parmi les NKT, on retrouve les NKT de type I pour invariant NKT (iNKT) cells constituant le sous-groupe cellulaire le mieux caractérisé des populations CD1d LT. Les NKT expriment un TCR Vαβ qui ne varie pas et sont connues pour leurs capacités à produire rapidement des quantités élevées de cytokines de type Th1, Th2, et Th17 après une stimulation par les complexes CD1d/antigène (Wang, H., & Hogquist, K. A. 2018).

Cette population de cellules NK et NKT peuvent alors assurer leurs fonctions effectrices au travers de la réponse immune adaptative et innée (Figure 9).

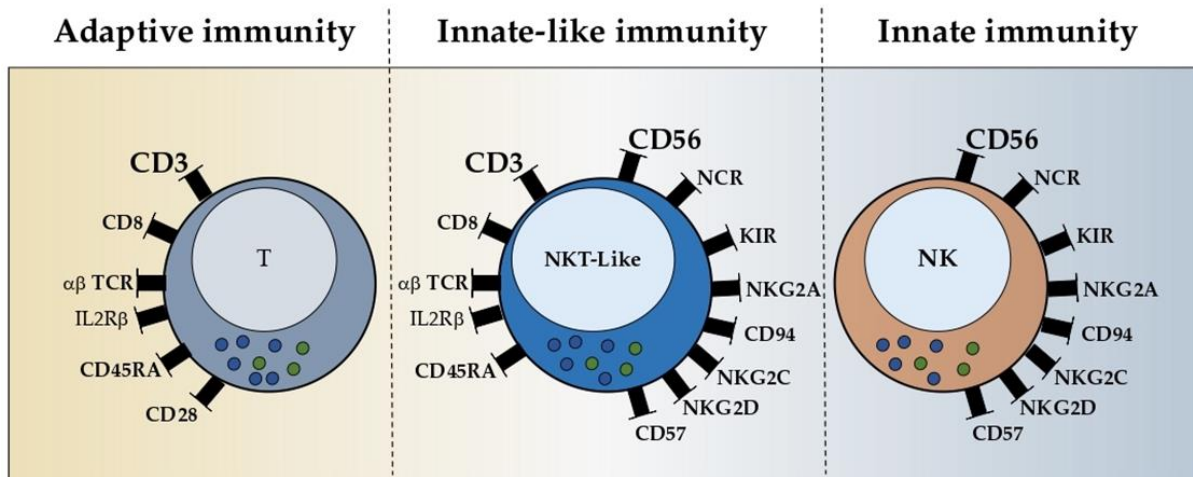


Figure 9 Récepteurs des différentes populations de cellules NK

Les cellules de phénotype NK acquièrent l'expression du marqueur CD56. Au milieu, le répertoire de récepteurs des cellules NK like est représenté, à gauche le répertoire de récepteurs des cellules T communs avec les NK like, et à droite le répertoire de récepteurs NK communs aux NK like. Les LT et NK interviennent toutes deux dans la réponse immunitaire adaptative et innée respectivement alors que le sous-type NKT like est rattaché à la réponse innée dû au fait des mécanismes communs avec les LT et NK. Une cellule NKT like mature est CD45RA et CD57 positive et possède un nombre varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs comme le NCR, KIR, NKG2A/C/D, $\alpha\beta$ TCR et IL2R β . Les NKT like ont la capacité de produire des cytokines en grand nombre et ainsi exécuter leur pouvoir cytotoxique. Les couleurs bleues et vertes représentent les granules et les cytokines. Sur le schéma sont mentionnés le TCR—T cell receptor; NCR—natural cytotoxic receptor; KIR—killer-cell immunoglobulin-like receptor. (D'après Almeida, J et al. 2023)

I.1.5 Cellule B

L'un des acteurs prépondérants dans la réponse immunitaire est le Lymphocyte B (LB). Il constitue également la cellule d'étude dans le cadre de mes travaux de thèse en lien avec la dérégulation de la voie NF- κ B dont nous reparlerons. Dans ce paragraphe nous allons développer les caractéristiques principales ainsi que les fonctions des LB, le chapitre 2 du manuscrit sera consacré à leur développement de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes.

La première observation microscopique des LB remonte aux travaux de Flemming en 1885 au travers de l'observation dans les tissus lymphoïdes de foyers de divisions cellulaires.

L'étude détaillée de cellule B a débuté au cours des années 1960 1970 en parallèle des études menées sur la cellule T. Au départ, le but premier de la cellule B est de remplir des fonctions de production et de médiation de la réponse immunitaire (Good, R. A., & Zak, S. J. 1956). Les LB sont intimement liés à la notion d'immunité humorale souvent opposée à la médiation de la réponse immunitaire cellulaire (Figure 10). En 1890, Emil Behring et Shibasaburo Kitasato démontrent que les souris immunisées contre la diphtérie et les toxines responsables du tétanos sont capables de développer dans leur sang des cellules pouvant assurer des activités antitoxiques. Cette propriété clé de protection peut alors être conférée à d'autres animaux par le biais du sérum (Behring, E. & Kitasato, S, 1890). Ce processus a également été démontré

dans le cas de la réponse immune humorale contre les toxines de plantes comme le ricin ou l'abrine (*Ehrlich, P. 1891*) et un peu plus tard la preuve que cette réponse humorale est capable de lyser les organismes responsables du choléra et de la typhoïde (*Pfeiffer, R.Z.1895*). C'est en 1960 que Brunet propose la théorie de la sélection clonale permettant d'expliquer les fonctions des LB et LT ainsi que leur réponse en cas de rencontre avec un antigène dans l'organisme. Frank Macfarlane Brunet décrit ainsi le processus de formation des anticorps lors des étapes initiales de la réponse immune. Cette théorie de sélection clonale de Brunet est également utilisée dans les études portant sur la tolérance immunologique des cellules cancéreuses pouvant être expliquée par ce principe de sélection clonale. Selon les travaux de Andor, Maley et Hanlee, la sélection clonale est alors définie comme la capacité d'un organisme à tolérer et à résister à l'introduction de cellules sans déclencher de réponse immunitaire tant que les cellules sont introduites aux premiers stades du développement de l'organisme (*Andor, N., Maley et al.2017*). Le principe de diversité moléculaire des immunoglobulines rendu possible par le réarrangement des gènes dans les cellules B en développement sera expliqué en 1988 par Tonegawa (*Tonegawa, S. 1988*). C'est grâce aux gènes *RAG* (Recombination Activating Gene) que peut avoir lieu le processus de réarrangement VDJ des segments d'Immunoglobulines (Ig) dans les LB, capables alors de générer une large diversité d'anticorps (*Schatz et al., 1989 ; Briney et al. 2012*). Les champs de recherche dans le but d'une meilleure compréhension des LB sont vitaux car nous verrons également dans ce paragraphe comment ces cellules et leurs fonctions contribuent à différentes pathologies comme les maladies auto-immunes, les allergies et le cancer.

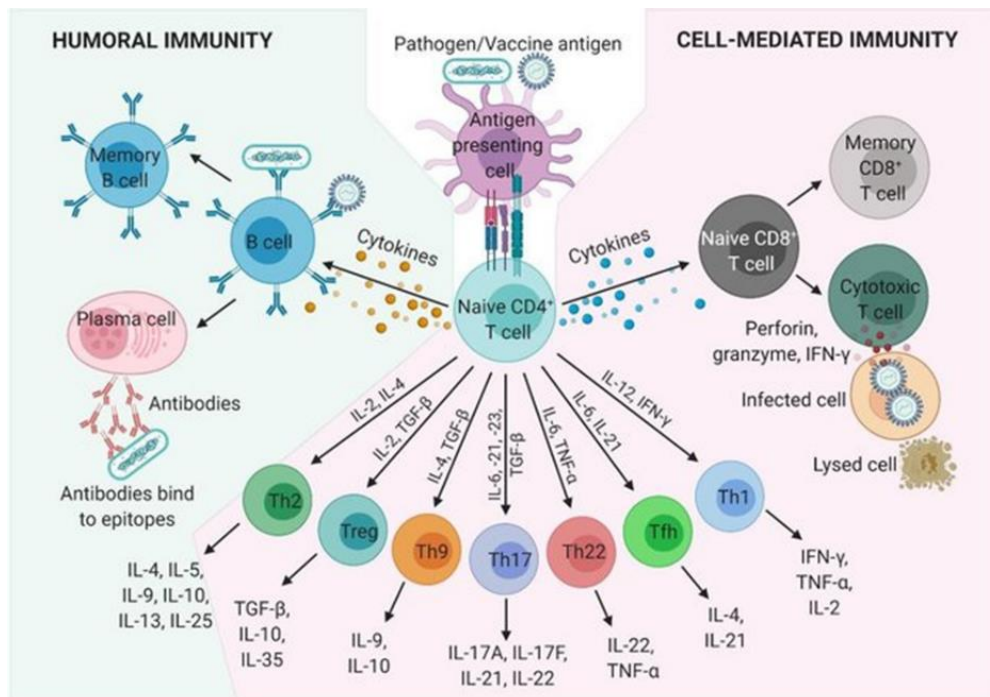


Figure 10. **Médiation humorale et cellulaire dans la réponse immune**

L'immunité adaptative requiert une activation ainsi qu'un développement des lymphocytes LT et LB après une rencontre avec un antigène. Les pathogènes, une tumeur ou un vaccin vont être reconnus par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Une fois activées, les peptides antigéniques sont présentés à la surface du CMH de classe II (CMHII) reconnu par les RT situés sur les cellules CD4⁺ naïves. Le RT désormais activé par les CPA, les LT CD4⁺ naïfs va se différencier en différents sous-populations T helper (Th)1, Th2, Th9, Th17, Th22, T follicular helper (Tfh), et T regulatory cells (Treg) en fonction d'un environnement cytokinique et de signaux de polarisation précis. Les LB co-stimulés par les cytokines produites via les LT CD4⁺ se transforment en cellules plasmiques alors capables de produire de grandes quantités d'anticorps pouvant ensuite rejoindre la circulation sanguine et les liquides extracellulaires. La réponse humorale est alors médiée par ces anticorps produits et sécrétés par les LB et sont donc spécifiques pour chaque antigène. Les LT CD8⁺ reconnaissent et se lient via le RT aux antigènes ayant été internalisés, présentés par les molécules du CMH de classe I situées à la surface des CPA et des cellules infectées. Les LT CD4⁺ libèrent alors des cytokines stimulant à leur tour les LT CD8⁺ pouvant relarguer des molécules effectrices telles que le granzyme, la perforine et les interférons γ (IFN- γ) qui vont détruire la cellule hôte infectée. Une petite population de cellules B et T mémoires permettront à l'organisme de se protéger de nouveau contre un pathogène ou antigène déjà rencontré. (IFN- γ , interféron gamma; IL, interleukin; TGF- β , transforming growth factor β ; TNF- α , tumor necrosis factor α) (Adapté de Schijns et al.2021)

Les LB représentent environ 15% des leucocytes présents dans la circulation sanguine. Leur caractéristique majeure est la capacité à produire des immunoglobulines (Ig). La structure générale d'une immunoglobuline est la suivante : 2 chaînes lourdes identiques de 50 KDa et de 2 chaînes légères identiques kappa κ ou lambda λ de 25 KDa (Figure 11). Les parties terminales des chaînes lourdes et légères peuvent varier en termes de séquences en acides aminés d'un anticorps à l'autre. Ces domaines variables sont appelés VH et Vk ou VL, respectivement. La juxtaposition d'un segment VH et d'un segment Vk ou VL initie la formation

du site de liaison à l'antigène de la molécule d'Ig. Les régions variables à la fois des chaînes lourdes et légères contiennent 3 sous régions hautement variables entre les différents anticorps. Ces séquences hypervariables sont assemblées ensemble dans l'Ig pour former le domaine de liaison à l'antigène. Chaque Ig a 2 sites identiques de liaison à l'antigène. La portion carboxy-terminale des chaînes lourdes et légères demeurent constantes dans chaque sous classe d'anticorps. Les régions constantes des chaînes lourdes s'assemblent pour former le domaine Fc de la molécule responsable de la majorité des fonctions effectrices de la molécule d'Ig, incluant la liaison au récepteurs Fc activant les système complément.

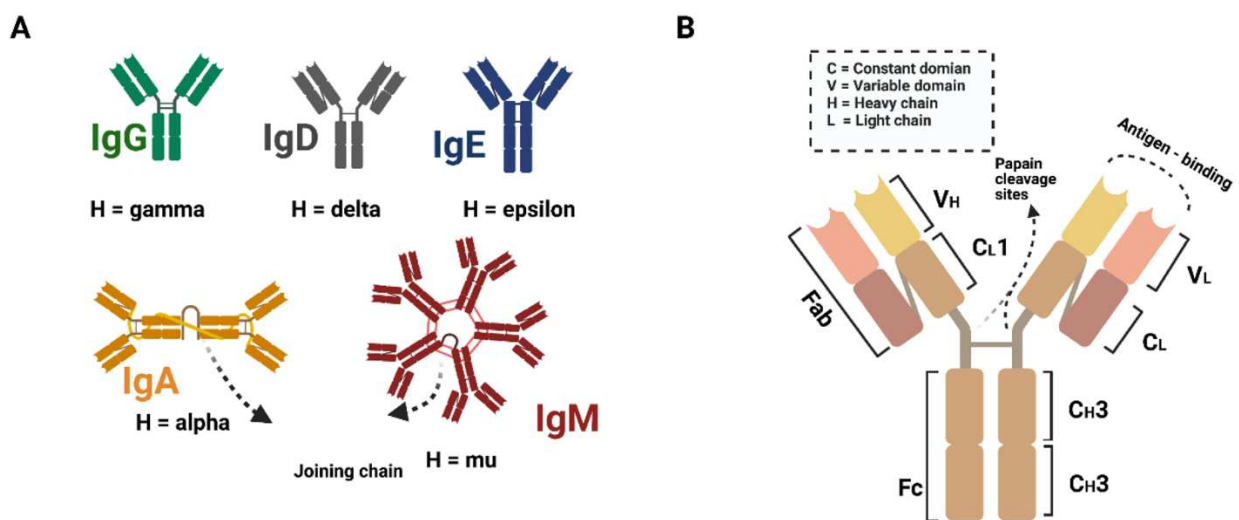


Figure 11. **Représentation schématique d'une Ig et de ses sous types IgG, IgA, IgD, IgE, IgA, IgM**

(A) IgM représente le sous type d'Ig le plus abondant 10-15% des Ig totales du sérum, IgD 0.2% et IgE 0.3% représente une proportion mineure des anticorps retrouvés dans le sérum. (B) Structure générale d'une immunoglobuline. (D'après Wu, Y., & Song, H. 2022)

Les gènes codant la chaîne légère κ sont retrouvés sur le chromosome 2, et les gènes de la chaîne légère λ sur le chromosome 22. Le locus complexe de la chaîne lourde est codé sur le chromosome 14. Les loci des chaînes lourdes et légères sont-elles mêmes composées d'une série de régions variables V (Variable) suivie de plusieurs segments D (Diversity) pour la chaîne lourde seulement ; et de certaines régions J (Joining) et C (Constant Region) exons. Les régions constantes de chaînes légères κ et λ sont codés sous forme d'exons uniques alors que les gènes de la chaîne lourde contiennent des exons pouvant coder 9 régions constantes différentes très utiles pour produire les différentes classes et sous classes d'Ig.

Les LB dérivent d'une Cellule Souche Hématopoïétique (CSH) de la moelle osseuse. C'est à cet endroit que le BCR (B cell receptor) est assemblé grâce à des mécanismes dépendants de RAG1/RAG2 similaires à ceux utilisés pour la production d'un TCR fonctionnel (Thomas, L. R et al. 2009). La portion terminale en acides aminés de chaque chaîne lourde est initiée par la jonction somatique de gènes codants les domaines des régions VH (Variables), DH

(Diversity) et JH (Joining). Les gènes JH codent des éléments à la fois variables et constants de la chaîne capables de générer la portion terminale de celle-ci. Les jonctions VDJ alors formées par cette recombinaison constituent la région hypervariable contribuant au bon assemblage du site de liaison à l'antigène. La diversité de cette région hypervariable est la résultante de la diversité combinatoire VDJ mais également de la diversité jonctionnelle liée à l'action d'une enzyme clé la TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) exprimée lors du développement B médullaire où les réarrangements VDJ ont lieu. L'initiation de la recombinaison V(D)J repose sur l'activation de 2 gènes *RAG-1* et *RAG-2* (recombination activating genes 1 and 2) qui sont exprimés seulement au sein des lymphocytes en développement. Ainsi, les RAG vont induire une cassure double brin entre l'extrémité du segment de gène réarrangé et les séquences de signal de recombinaison adjacentes (Figure 12). Ces cassures induisent la mise en place de processus de réparation de l'ADN comme le mécanisme de jonction d'extrémités non homologues NHEJ (non homologous end-joining) commun à l'ensemble des types cellulaires.

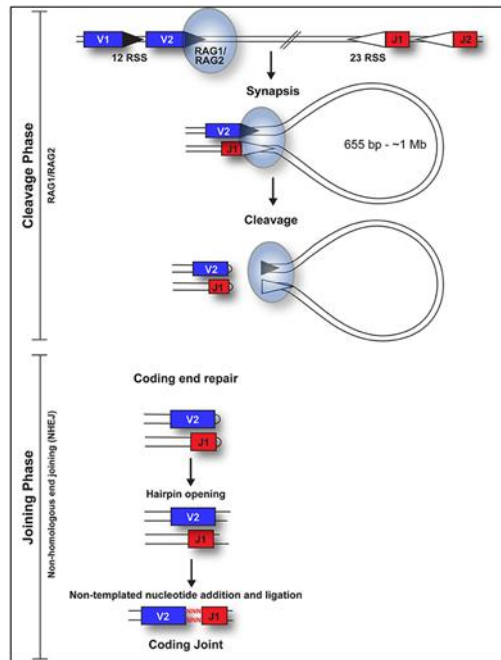


Figure 12. Mécanisme de recombinaison VDJ

Représentation de l'ensemble des phases de clivage et de jonction de la recombinaison V(D)J. La phase de clivage débute lorsqu'un complexe d'hétéro-tétramère RAG1 + RAG2 (ovale bleu) se lie à un 12-RSS (triangle plein) ou à un 23-RSS (triangle ouvert), avec les séquences consensus indiquées. Ce processus crée ensuite un complexe avec un partenaire RSS de la longueur complémentaire de l'espaceur. Le complexe RAG coupe ensuite un brin d'ADN de chaque RSS et catalyse l'attaque hydrophile par le groupe hydroxyle résultant sur l'autre brin d'ADN dans une réaction de trans-estérification directe, pour générer des extrémités codantes en épingle à cheveux et des extrémités de signal émoussées. Les extrémités codantes et signal sont réparées par la machinerie NHEJ, bien que les extrémités codantes soient souvent réparées de manière imprécise pour augmenter la diversité, comme l'indiquent les nucléotides rouges. Les extrémités signal restent liées aux protéines RAG jusqu'à ce que l'expression de RAG soit régulée négativement ; la ligature ultérieure des extrémités signal forme une articulation signal (SJ) et aboutit à la génération d'un cercle épisomique, le cercle signal excisé (ESC). Chez l'homme, ceux-ci vont de 655 pb (au locus TCRB) à ~ 1 Mb (au locus IgH). (D'après Smith et al.2019)

Le processus de recombinaison VDJ débute par l'action de la recombinase qui va fusionner une région DH à une région JH suivi d'une délétion des séquences d'ADN intermédiaires, à noter que cette recombinaison DHJH a lieu sur les deux chromosomes. Après cette étape, la recombinase assemble une région VH au segment DHJH réarrangé. La TdT s'exprime à cette période et permet l'addition de nucléotides de façon aléatoire sur les sites DH-JH et VH-DHJH recombinaison, leur conférant une grande diversité de combinaison en acides aminés codés par le gène VHDHJH réarrangé. Ce gène VHDHJH forme la majeure partie de la région 5' de la chaîne lourde réarrangée suivie par une série d'exons en aval codant les régions constantes pour produire une IgM ; bien plus loin se situent les exons codant la région constante de la chaîne lourde utilisée pour constituer une IgD (Figure 13).

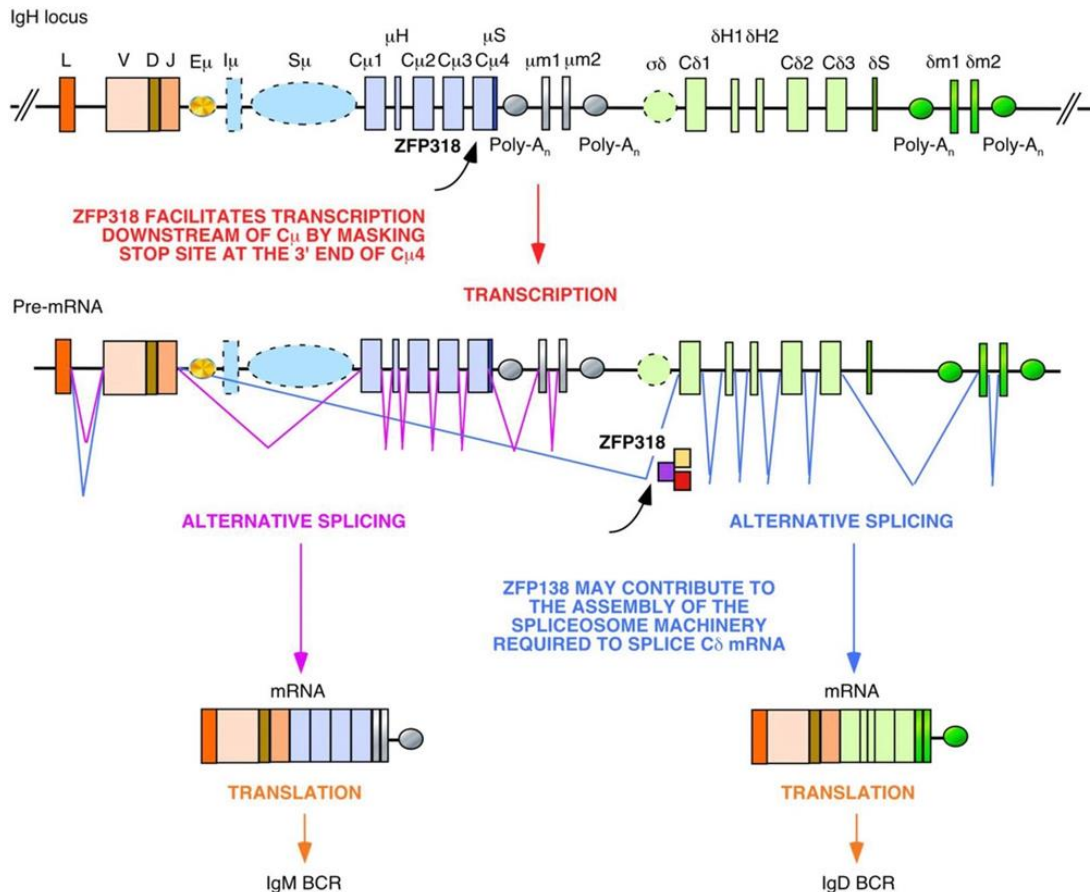


Figure 13. Mécanismes de l'épissage alternatif pour la co-expression d'IgM et d'IgD de surface

Les cellules B matures transcrivent constitutivement les gènes VDJ, C_μ et C_δ pour former un long pré-ARNm via un processus impliquant ZFP318. Celle-ci facilite la transcription du gène C_δ en masquant un site d'arrêt dans la partie terminale du gène C_μ. Le pré-ARNm résultant subit alors un épissage alternatif pour éliminer les introns et favoriser la double expression des ARNm matures VDJ-C_μ et VDJ-C_δ codant pour les récepteurs IgM et IgD. ZFP318 peut également faciliter l'épissage des exons C_δ inclus dans le pré-ARNm, notamment en favorisant l'assemblage de la machinerie spliceosome au site de départ 5' des exons C_δ. Les différents graphiques représentent un segment du locus IgH humain et le pré-ARNm et les ARNm matures résultants. L, séquence de tête. E_μ, IgH enhancer μ, également appelé IgH 5' enhancer ou IgH intronic enhancer. I_μ, exon d'initiation μ. μS, segment 3' de l'exon C_μ4 codant pour la pièce sécrétoire (S) d'IgM. Poly-A_n, exon terminal de polyadénylation. μm, exon codant pour la région transmembranaire des IgM. αδ, région de commutation cryptique. δH, exon codant pour la région charnière (H) des IgD. δS, exon codant pour la pièce sécrétoire d'IgD. δm, exon codant pour la région transmembranaire des IgD. (D'après Gutzeit, C et al. 2018)

Les chaînes μ et δ résultent d'un épissage alternatif de l'exon VHDHJH soit vers des exons μ ou des exons δ. Si les réarrangements des régions VH, DH et JH arrivent à produire un transcrit de chaîne lourde se situant dans le cadre de lecture et codant des protéines fonctionnelles de cette même chaîne lourde, alors celle-ci va être synthétisée et assemblées dans la cellule avec deux protéines clés λ5 et VpreB agissant comme des substituts de la chaîne légère. Cet ensemble constitue alors un pré-BCR à la surface de la cellule (Figure 14) prévenant ainsi le réarrangement VH à un segment DHJH sur l'autre chromosome assurant

ainsi la capacité à la cellule B en développement une spécificité antigénique. Ce processus porte le nom d'exclusion allélique. En revanche, si le premier réarrangement VHDHJH n'est pas dans le cadre de lecture et ne produit pas de chaîne lourde fonctionnelle, alors le gène VH ira se réarranger sur l'autre chromosome dans la seconde tentative de génération d'un réarrangement de la chaîne lourde fonctionnelle. Si cette seconde tentative failli, la cellule est éliminée par apoptose.

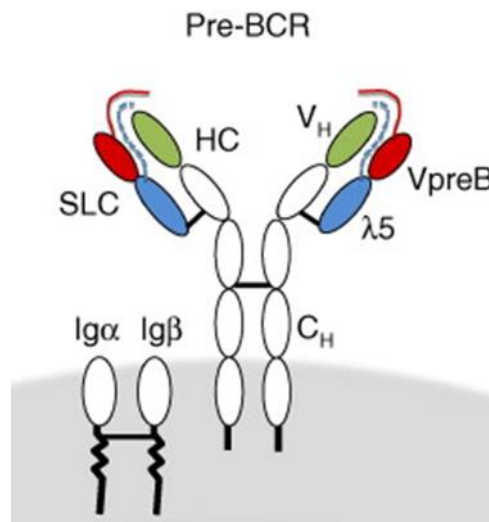
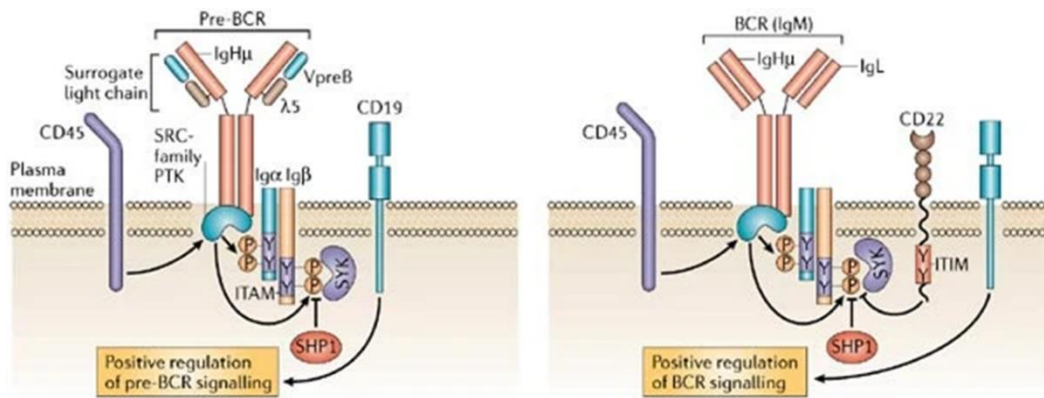


Figure 14. **Représentation schématique du Pre BCR**

Le Pre-BCR est constitué de 2 chaînes HC lourdes recombinées (HC vert) et une chaîne SL (SLC) qui consiste en 2 polypeptides invariants λ5 (bleu) et VpreB (rouge). (D'après Mårtensson, I et al. 2010)

Une fois la chaîne lourde produite, la cellule va alors diminuer l'action de la TdT et initie le réarrangement de la chaîne légère. En premier, un segment V_k se réarrange avec un segment J_k formant ainsi une chaîne légère fonctionnelle. Ensuite la chaîne légère κ s'associe avec la chaîne lourde pour former une protéine d'immunoglobuline Ig fonctionnelle et tout autre réarrangement de la chaîne légère est stoppé. Si le premier réarrangement κ est un échec, alors le processus continue mais sur l'autre chromosome. Si encore une fois le réarrangement n'est pas fonctionnel, alors le réarrangement de la chaîne λ a lieu. Les deux gènes RAG1 et RAG2 sont exprimés durant les phases de réarrangements de la chaîne lourde et légère. Cet ensemble de processus donne naissance à ce que l'on appelle le répertoire B. Le répertoire des cellules B est défini comme la faculté de chaque LB à développer un unique récepteur B et chaque récepteur constitue alors le répertoire B (Zheng, B et al.2022). Ce répertoire est rendu possible par la différenciation des progéniteurs B dans la moelle sous la dépendance des cellules stromales assurant la production d'IL-7. Les LB en développement vont alors suivre un programme de différenciation. Comme le TCR décrit précédemment, la cellule B mature possède un récepteur complet incluant également des protéines transmembranaires appelées Iγα et Igbeta responsable de l'activation des signaux intracellulaires après que le récepteur se soit lié à l'antigène (Figure 15).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figure. 15 Composition du Pré-BCR de la cellule B et des complexes BCR

Le pré-BCR et le BCR contiennent tous deux une forme transmembranaire de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) qui est associée de façon non covalente à un hétérodimère d'Igα et d'Igβ, et la chaîne légère de substitution (SLC), qui est composée de λ5 et VpreB, ou la chaîne légère d'immunoglobuline (IgL), respectivement. La signalisation est initiée par la phosphorylation médiée par la protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille SRC des motifs d'activation à base de tyrosine des immunorécepteurs Igα et Igβ (ITAM), générant ainsi des sites d'amarrage pour l'homologie cytosolique SRC 2 (SH2) -domain- contenant la PTK rate tyrosine kinase (SYK). CD19 et CD45 interagissent avec les pré-BCR et BCR et sont des régulateurs positifs de la signalisation. Inversement, les co-récepteurs tels que CD22 (illustré), CD72, CD5 et le récepteur apparié de type immunoglobuline B (PIRB) sont des régulateurs négatifs de la signalisation BCR. Ces protéines transmembranaires contiennent des motifs inhibiteurs à base de tyrosine immunorécepteurs (ITIM) jouant le rôle de substrats pour les PTK de la famille SRC et fonctionnent afin de recruter des protéines tyrosine phosphatases cytosoliques (PTP) telles que la PTP 1 contenant le domaine SH2 (SHP1) vers le BCR. (D'après Monroe J.G 2006)

Les LB sont également dotées d'un complexe de corécepteurs : CD19, CD81 et CD21 activé par liaison à la protéine C3d. Que ce soit l'Igα ou l'Igβ, elles ont toutes deux des domaines ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dans leurs régions cytoplasmiques et utilisent une transduction du signal similaire aux LT. La famille des kinases SRC BLK, Fyn et Lyn font partie la voie de signalisation des LB car elles sont capables de phosphoryler les ITAM des Igα et Igβ. L'activation du signal est ensuite transmise par le biais de la tyrosine kinase Syk et la protéine linker BLNK aux autres composants situés en aval de la cascade, la phospholipase C et la « Guanine Nucleotide Exchange Factor ». Comme pour les LT, l'activation de la protéine kinase C, la mobilisation du calcium et l'activation RAS/RAC dépendante des MAP kinases entraînent l'expression de nouveaux gènes impliqués dans la prolifération et la maturation de la cellule.

Les cellules B matures naïves expriment à leur surface des IgM et des IgD et quittent la moelle osseuse. Dans les organes lymphoïdes secondaires après la rencontre avec l'antigène, ces LB poursuivent leur maturation sous l'influence des LT « helper » : les cytokines dérivées des LT sont à l'origine d'un événement de recombinaison de l'ADN appelé la commutation de classe ou CSR (class switch recombination) (Stavnezer, J., & Schrader, C. E. 2014). La CSR (Figure 16) est définie par un changement des fonctions effectrices des anticorps et améliore la capacité propre de ces anticorps à reconnaître et éliminer le pathogène. La CSR implique

le remplacement des régions constantes μ et δ de la chaîne lourde (CH) de l'Ig avec les régions CH γ , ϵ ou α .

Le réarrangement de l'ADN au cours de la CSR est médié par l'action de l'enzyme clé AID (activation-induced cytidine deaminase) dont nous reparlerons dans la partie développement B ; mais également des enzymes UNG (uracil-DNA glycosylase), l'endonucléase APE1 et l'enzyme de réparation de l'ADN DNA-PK. La commutation de classe va déplacer le segment VHDHJH pour le positionner directement en amont des exons alternatifs de la chaîne lourde permettant ainsi l'utilisation de cet exon VHDHJH réarrangé pour produire des anticorps de différents isotypes avec la même spécificité antigénique. L'IL-10 dérivée des LT va favoriser le « switch » vers des IgG1 et IgG3. L'IL-4 et l'IL-3 engagent le « switch » vers l'isotype IgE et le TGF β (Transforming Growth Factor β) vers l'IgA.

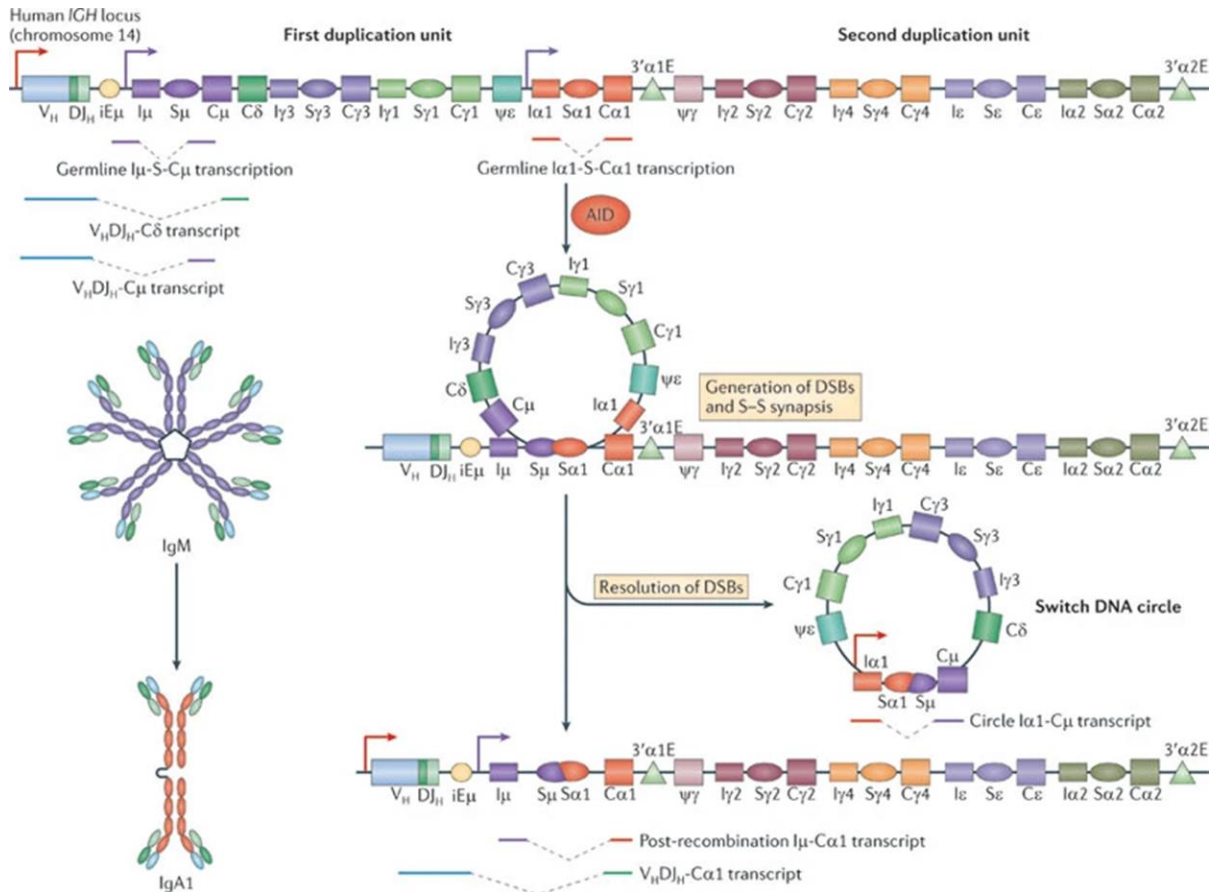


Figure 16. Mécanisme de Recombinaison de Classe des Immunoglobulines

Le mécanisme (CSR) permet d'échanger le gène codant pour la région constante de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (CH) avec l'un des gènes CH en aval (la figure représente la CSR entre S_μ et $S_\alpha1$ dans le locus de la chaîne lourde de l'immunoglobuline humaine (IGH)). Cette réaction de délétion-recombinaison nécessite l'action d'une enzyme clé : la cytidine désaminase (AID). L'AID induite par l'activation provoque ensuite la génération de cassures double brin (DSB) Double Strand Break de l'ADN dans les régions de commutation (S) (qui se trouvent en amont du gène CH) suivie d'une réparation de DSB. Cela conduit à la juxtaposition de l'ADN VHDJH réarrangé (qui code la région variable de la chaîne lourde) avec un groupe d'exons CH en aval et à la suppression de la séquence intermédiaire entre les régions S sous la forme d'un cercle extrachromosomique. ψ , pseudogène ; amplificateur $3'\alpha E$, $3'\alpha$; iE_μ , activateur intronique IGH ; Région intermédiaire IH, IGH. (Xu, Z et al 2012).

Les anticorps sécrétés, sont des glycoprotéines produites par les cellules B. Leur fonction est de reconnaître et de se lier de façon spécifique à des antigènes pouvant être des bactéries ou des virus afin de permettre leur élimination. La différence majeure entre les immunoglobulines et les anticorps repose sur le fait que les immunoglobulines possèdent un domaine transmembranaire dans le but de rester attachées à la membrane de la cellule B tandis que les anticorps ne possèdent pas cette caractéristique.

Il existe 5 sous-types des immunoglobulines chez les mammifères : immunoglobuline M IgM, immunoglobuline D IgD, immunoglobuline G IgG, immunoglobuline A IgA et immunoglobuline E IgE. Ces différents sous-types d'immunoglobulines diffèrent les uns des autres selon de taille,

nombre de polypeptides, charge, séquence d'acides aminés, et agencement des carbohydrates (d'après Male et al. Immunology 8th edition 2010). La plus abondante est l'immunoglobuline G (IgG) qui regroupe 4 sous-types les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 tandis que l'IgA se subdivise en 2 sous-types IgA1 et IgA2. Dans le sérum les anticorps sont polyclonaux et peuvent assurer la reconnaissance de différents antigènes. La plupart des anticorps sont qualifiés de bi-fonctionnels, sauf l'IgD, car ils assurent la reconnaissance de l'antigène de façon spécifique et promeuvent son élimination par le système immunitaire.

		Isotype	Structure (Vaillant et al.2022)	Fonctions
μ	IgM	IgM	Pentamère à hexamère (Key et al.2020)	Première ligne de défense contre les infections Modulation réponse et tolérance immunitaire (Liu et al.2019)
$\gamma 1$	IgG	IgG1	4 chaînes polypeptidiques	Abondante dans le serum Fonctions effectrices via liaison au récepteur Fc (Vidérsson et al.2014) Protection contre les infections à long terme
$\gamma 2$		IgG2		
$\gamma 3$		IgG3		
$\gamma 4$		IgG4		
$\alpha 1$ $\alpha 2$	IgA	IgA1	Monomère ou Dimère	Monomère -> sérum Dimère -> sécrétée Anticorps sécrété major dans la salive, les larmes, le colostrum, l'intestin, tractus génital, et sécrétions respiratoires Protection des surfaces épithéliales (Daha, M. R., & van Kooten, C. 2016)
		IgA2		
δ	IgD	IgD	Monomère	Lymphocyte différenciation (Goding e.1978)
ϵ	IgE	IgE	Monomère	Protection contre parasites, liaison au cellules mastoïdes et basophiles, réaction allergiques (Mauer et al.2018; Mukai et al.2016; Schwartz et al.2016)

Table 1. Familles d'Immunoglobulines et fonctions effectrices

Tableau récapitulatif des classes, noms, isotypes structures et fonctions des différentes immunoglobulines chez l'Homme

En même temps que les LB subissent la CSR, un autre processus se produit lors de l'activation et produit des mutations aléatoires dans la portion du site de liaison à l'antigène de la chaîne lourde et légère, c'est le processus d'hypermutation somatique (Figure 17). Il nécessite également AID, UNG, APE1 et des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces mutations sont responsables d'un gain d'affinité pour l'antigène, alors la cellule produisant cet anticorps aura un avantage prolifératif en réponse à l'antigène et dominera le pool de cellules B de haute affinité, c'est l'expansion clonale. Ces événements de mutation somatique ainsi que l'expansion clonale ont lieu dans le centre germinatif ; structure qui sera détaillée dans le chapitre 2 de ma thèse, avec les tissus lymphoïdes secondaires.

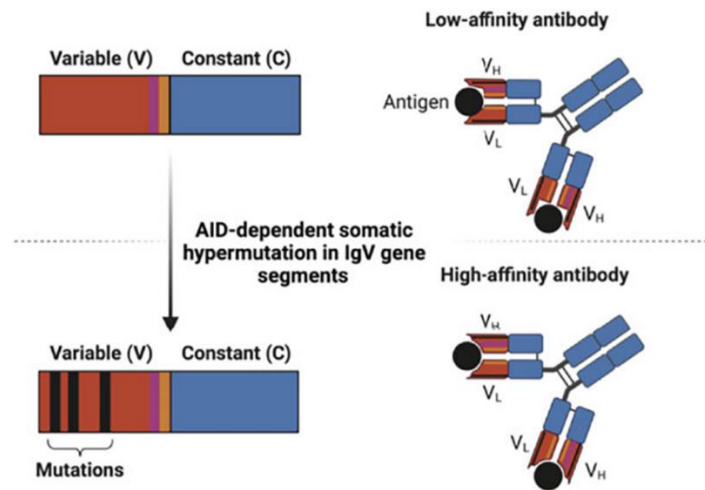


Figure. 17 Mécanisme d'hypermutation somatique (SHM)

L'hypermutation somatique (SHM) est le phénomène physiologique utilisant des mutations programmées dépendantes de l'AID dans la région variable des segments de gènes d'anticorps pour créer un grand nombre d'anticorps dans le but d'engendrer une plus grande affinité pour l'antigène. Chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) d'anticorps, ainsi que l'antigène (cercle noir) (D'après Gullickson, P et al.2022)

La réponse B peut être dépendante ou indépendante d'une interaction avec les LT (Figure 18). Dans le premier cas, l'activation des LB par l'antigène conduit, après internalisation du complexe BCR/antigène, à la présentation des peptides antigéniques via le CMH de classe II aux LT ayant un TCR spécifique. Les LB deviennent donc des APC (Antigen Presenting Cell) pour les LT CD4⁺ (Adler, L et al. 2017). Ce phénomène augmente l'expression des molécules de CMHII ainsi que l'expression des marqueurs CD80 et CD86 par le LB. Par conséquent les LT activés par cette combinaison de co-stimulation et via l'axe TCR/CMHII/peptide antigénique induisent à leur tour des signaux réciproques aux LB via l'interaction CD40L (ligand LT)) et CD40 (LB).

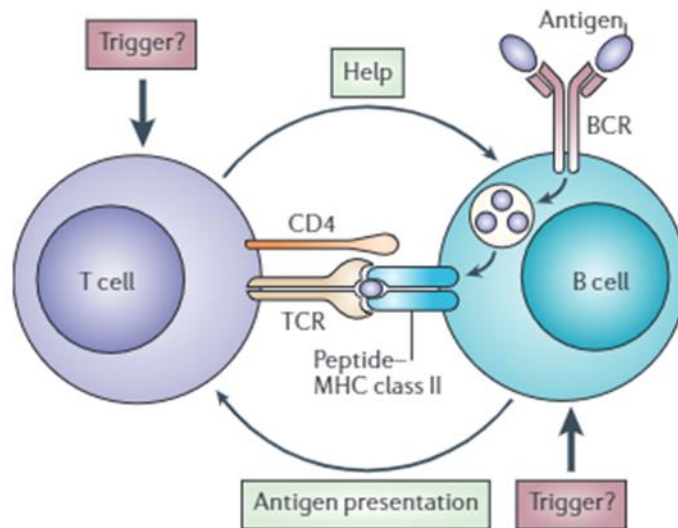


Figure 18. Schéma descriptif des Interactions entre lymphocytes B-cellules T

L'interaction bidirectionnelle entre les lymphocytes B et les lymphocytes T fournit la base du concept selon lequel, dans certaines maladies auto-immunes, un cycle d'amplification pourrait permettre l'émergence d'une immunopathologie. Cela serait dû à un facteur « déclencheur » mineur mais possédant des conséquences graves. En effet, même mineur, cela induirait des événements anormaux dans la cellule B ou la cellule T incluant la génération aléatoire dans le BCR ou le TCR. (D'après Edwards, J. C., & Cambridge, G. 2006)

La signalisation via le CD40 est essentielle pour la CSR, par ailleurs ce processus ainsi que l'hypermutation somatique sont impliqués dans l'obtention des lymphocytes B mémoires. La réponse mémoire permet de répondre rapidement à la menace d'un antigène lors d'une seconde rencontre avec celui-ci (Palm, A. K. E., & Henry, C. 2019 ; Dogan et al.2009 ; Yoshida et al.2010 ; Pape et al.2011 ; Mcheyzer-Williams et al. 2015).

Enfin, la réponse B indépendante d'une interaction avec les LT permet aux antigènes polymériques d'activer les cellules B. L'explication la plus probable à ce phénomène est la capacité de ces antigènes polymériques à s'associer et induire la formation d'un cluster d'Ig à la surface du LB. La réponse B indépendante d'une stimulation T inclue également le LPS (Bacterial Lipopolysaccharide), d'autres types de polysaccharides et certaines protéines polymériques. A noter que l'hypermutation somatique n'a pas lieu dans la réponse B indépendante d'une stimulation T, entraînant de ce fait une mémoire immunitaire plus faible.

La réponse immune qu'elle soit innée ou adaptative repose sur un ensemble d'acteurs moléculaires et cellulaires aux structures diverses. A noter que le système immunitaire chez l'Homme et la souris sont très proches et de nombreux travaux ont montré la pertinence de l'utilisation de modèles murins afin de mieux comprendre la réponse immune chez l'Homme (Shay, T et al 2013 ; Masopust, D et al. 2017). La signalisation au travers du récepteur B regroupe un ensemble de grandes voies de signalisation clé (Figure 18) comme la voie des MAPKinases, la voie NFAT, la voie AKT/mTor et enfin la voie NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) (Young, R. M., & Staudt, L. M. 2013).

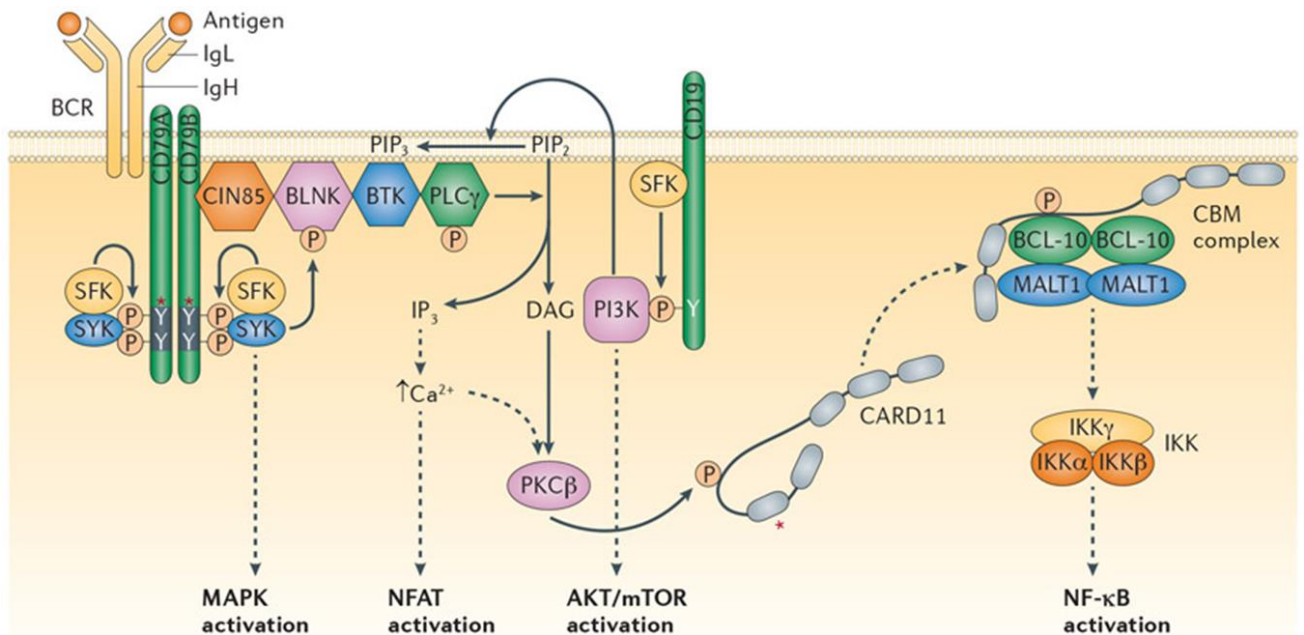


Figure 19. Voies de la signalisation au travers du BCR

Le récepteur des cellules B (BCR), le co-récepteur CD19 et divers intermédiaires de signalisation sont engagés, après la liaison du BCR à l'antigène. Plusieurs voies en aval du signal peuvent être déclenchées, comme indiqué. L'astérisque indique les régions protéiques affectées par des altérations somatiques récurrentes dans les lymphomes humains (détaillées dans la partie 3 de cette thèse). BLNK, protéine de liaison des lymphocytes B ; BTK, Bruton tyrosine kinase ; CARD11, protéine 11 contenant le domaine de recrutement de la caspase ; CBM, CARD11–BCL-10–MALT1 ; CIN85, protéine interagissant avec Cbl de 85 kDa ; DAG, diacylglycérol ; IKK, inhibiteur de NF-κB kinase ; IgH, chaîne lourde d'immunoglobuline ; IgL, chaîne légère d'immunoglobuline ; IP₃, triphosphate d'inositol ; MALT1, protéine 1 de translocation du lymphome du tissu lymphoïde associée aux muqueuses ; MAPK, protéine kinase activée par un mitogène ; mTOR, cible mammifère de la rapamycine ; NF-κB, facteur nucléaire-κB ; NFAT, facteur nucléaire des lymphocytes T activés ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; PIP₃, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ; PKCβ, protéine kinase Cβ ; PLCγ, phospholipase Cy ; SFK, kinase de la famille SRC (D'après Young, R. M., & Staudt, L. M. 2013)

La voie NF-κB régule à la fois les deux types de réponses immunitaire humorale et cellulaire. Elle est activée en réponse à une grande variété de stimuli comme les pathogènes, les signaux de stress cellulaire, et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IL-1 (Li, Q., & Verma, I. M. 2002). NF-κB est au cœur des travaux de recherche menés au cours de cette thèse, nous allons donc décrire les signalisations conduisant à l'activation des complexes NF-κB dans un contexte physiologique.

Chapitre I. Partie 2 Voie classique ou canonique NF- κ B

I.2 Historique de la découverte de la voie NF- κ B

Dans la mini revue « Discovering NF- κ B » (*Baltimore, D. 2009*), Baltimore revient sur les étapes clés menant à la découverte de NF- κ B. La première description de NF- κ B a été faite dans les années 1980, avec les investigations portant sur le réarrangement de la chaîne lourde (*Siden, E et al. 1981*) et l'étude de la chaîne légère kappa par Queen et Baltimore (*Queen, C., & Baltimore, D. 1983*). La technique clé pour trouver des facteurs de transcription associés aux promoteurs est la technique EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ou retard sur gel. Cette technique est à la fois qualitative et quantitative et permet la caractérisation et surtout la détection d'interactions protéines/ADN. Elle repose sur l'utilisation de protéines et d'acides nucléiques combinés, et ces mélanges sont ensuite soumis à l'électrophorèse en conditions natives sur un gel de polyacrylamide. Après électrophorèse, la distribution des protéines associées aux acides nucléiques marqués au ^{32}P est déterminée par autoradiographie (*Hellman, L. M., & Fried, M. G. 2007*). En 1986, cette technique a permis la découverte de multiples facteurs se liant à la fois à des « enhancers » de la chaîne lourde et de la chaîne légère κ des immunoglobulines (*Sen, R., & Baltimore, D. 1986*). Parmi ces facteurs, un seul est capable de se lier aux « enhancers » de la chaîne légère kappa couvrant la séquence GGGACTTCC. Il fut appelé NF- κ B car ce facteur est nucléaire, se lie de manière spécifique à l'« enhancer » kappa et fut découvert dans des extraits de cellules B tumorales.

I.3 Sous-unités activatrices

NF- κ B est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'apoptose, la prolifération et la survie cellulaire (*Fullar et al.2012*). NF- κ B joue un rôle majeur dans l'immunité innée et adaptative à travers la maturation et la prolifération des cellules B et T (*Vallabhapurapu et al.2009*). Nous reviendrons sur cette fonction clé dans la maturation de la cellule B au cours du chapitre 2 de la thèse.

NF- κ B est une famille de facteurs de transcription au nombre de cinq chez les mammifères : p50, p52, RelA ou p65, RelB et c-Rel (*Hayden et Ghosh 2008*). Les précurseurs de p50 et p52 sont respectivement p105 (NFKB1) et p100 (NFKB2). Ces cinq sous unités protéiques vont former des dimères ou des hétérodimères impliqués dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles. p50, p52, RelA, RelB et c-Rel sont séquestrées dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices regroupant I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ . Dans la littérature, il est décrit deux voies principales d'activation de NF- κ B : une voie dite canonique et une voie alternative (Figure 20). Dans un premier temps, nous allons décrire la voie classique ou canonique de NF- κ B.

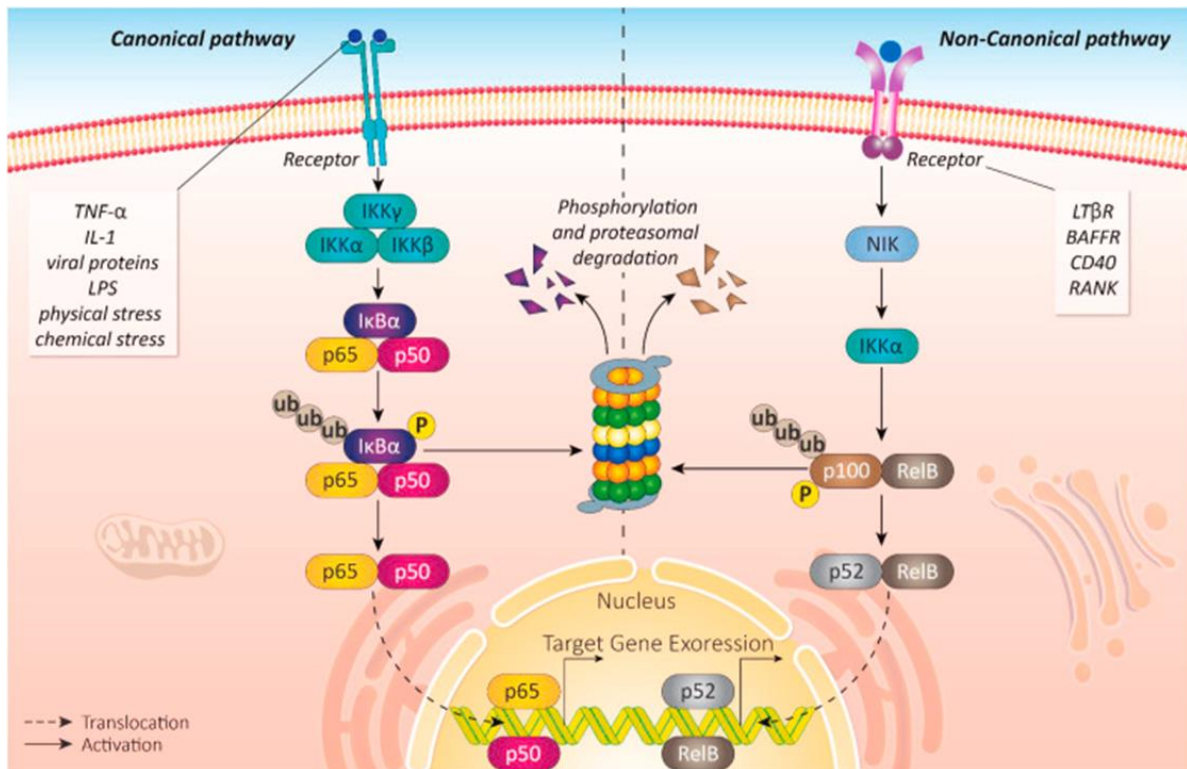


Figure 20. Représentation de la voie de signalisation NF-κB, voie classique à gauche et voie alternative à droite (D'après Mirzaei, S et al 2021)

La voie canonique nécessite la phosphorylation des protéines IκB par un complexe multiprotéique IκB kinase (IKK) composé de deux sous unités catalytiques IKKα (IKK1) et IKKβ (IKK2). La régulation du complexe IKK s'effectue grâce à une sous unité régulatrice IKKγ ou NEMO (NF-κB essential modifier) (Jost et Ruland 2007). De plus, la voie canonique requiert l'activation et la libération principalement de RelA/p50 et/ou c-Rel/p50 rendue possible par la phosphorylation de IκB, suivie de sa dégradation protéasomale. Cette voie canonique cible notamment des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, l'inflammation et l'immunité innée et adaptative (Gasparini et al.2014). L'activation de la voie classique est mobilisée par le BCR (B cell receptors), le TNFR (tumor necrosis factor), les TLR/IL1-R (Toll-like receptor/Interleukin (IL)-1) et le CD40 (cluster of differentiation 40). L'un des principaux inhibiteurs de la voie NF-κB est l'A20 déubiquitineuse, essentielle pour le bon maintien de l'homéostasie immunitaire (Shembade et al.2012).

I.3.1 Récepteurs impliqués

La signalisation NF- κ B va pouvoir s'effectuer par le biais de récepteurs divers et variés représentés sur la figure 21.

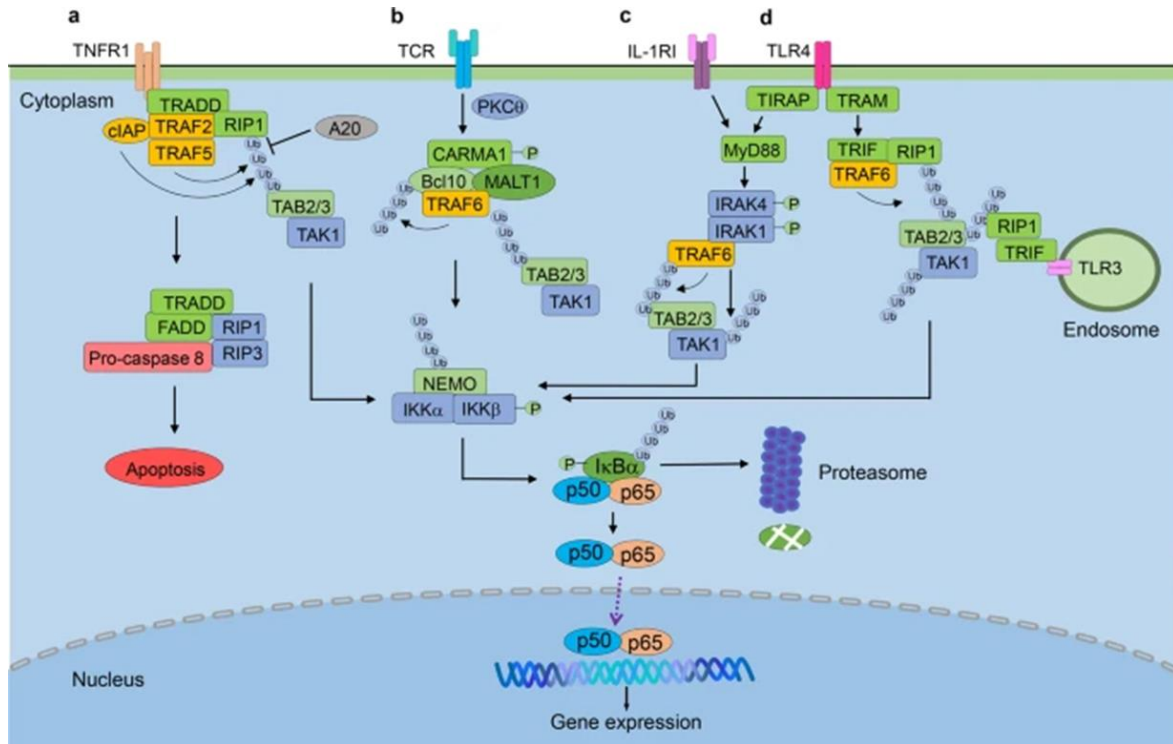


Figure 21 Récepteurs impliqués dans la voie canonique NF κ B

Signalisation impliquant a) Le TNFR ; b) Le RT ; c) IL1RI et d) TLR4 et voies de signalisation associées à la transduction du signal NF- κ B (D'après (Yu, H et al. 2020))

I.3.1 a Signalisation via le récepteur TNFR

L'activation du récepteur TNFR1 (Tumor Necrosis Factor receptor 1) conduit au recrutement de TRADD (TNF-R-Associated Death Domain) et favorise les interactions des ubiquitines ligase E3 cIAP1/2, TRAF2 et la protéine kinase RIP1. RIP1 est par la suite polyubiquitinylée de façon K63 dépendante et peut alors recruter NEMO (NF- κ B Essential Modulator) afin de former le complexe TAK1-IKK. TAK1 va phosphoryler et activer IKK β pouvant ainsi induire la phosphorylation et la dégradation de I κ B α permettant alors la libération et la translocation des dimères NF- κ B vers le noyau afin de moduler la transcription de gènes cibles.

I.3.1 b Signalisation via le récepteur des LT

La signalisation via une stimulation dépendante des LT induit l'activation de la voie canonique/classique NF- κ B au travers du complexe CARD11/Bcl10/MALT1 (CBM). CARD11 (caspase recruitment domain family member 11) ; Bcl10 (Bcl10 Immune Signaling Adaptor) ; MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1). Après une stimulation, CARD11(CARMA1) est recruté et phosphorylé par l'action de la PKC- θ , protéine

kinase $C\theta$ induisant le recrutement et la mobilisation de Bcl10 et MALT1 pour former le complexe CBM. MALT1 recrute à son tour TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6), capable de médier une ubiquitinylation K63 dépendante pour lui-même et pour Bcl10 suivi d'une activation de TAK1 et d'une activation de la voie canonique/classique de NF- κ B médiée par les IKK.

I.3.1 c Signalisation via les récepteurs IL-1RI et TLR

Les récepteurs IL-1RI (Interleukin 1 receptor ou CD121a) et TLR (Toll Like Receptor) (c ; d sur la Figure 21) vont médier la transduction du signal via MyD88, un adaptateur cytosolique jouant un rôle dans la réponse immune. Le TLR4 va recruter TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) et TRAM qui mobilisent à leur tour MyD88 et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β). IL-RI, lui, recrute directement MyD88. MyD88 va induire le recrutement des IRAK1 et 4 (Interleukin-Receptor-Associated Kinase) qui vont aller interagir avec TRAF6 pour activer le complexe TAK1 (Transforming growth factor- β (TGF- β) -activated kinase 1) et les voies de signalisation en aval.

L'activité de la voie de signalisation classique/canonique de NF- κ B peut être régulée à de multiples niveaux. L'expression de A20 est activée par NF- κ B et conduit à la déubiquitinylation de RIP1, TRAF6 et NEMO afin de déstabiliser le complexe IKK.

I.3.2 Complexe IKK γ , IKK α et IKK β

Il existe des similarités et des particularités propres aux sous unités IKK γ , IKK α et IKK β (Figure 22).

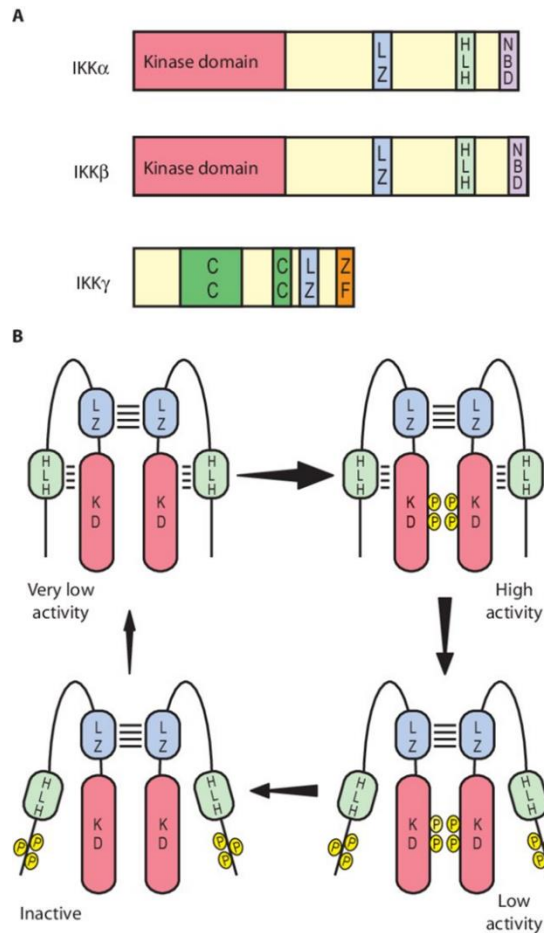


Figure 22 Représentation schématique de IKK α , IKK β et IKK γ et processus d'activation

(A) Représentation schématique des principales sous-unités IKK, IKK α , IKK β et IKK γ , leurs structures et leurs motifs fonctionnels. LZ, leucine zipper; HLH, helix-loop-helix; CC, coiled coil; ZF, zinc finger; NBD, NEMO-binding domain. (B) Modèle de régulation au travers de l'autophosphorylation des sous unités IKK. Les sous-unités catalytiques IKK sont dimérisées au travers de leurs motifs LZ. Le motif HLH interagit avec le domaine kinase. C'est la phosphorylation de deux sérines clés dans la boucle d'activation de la sous-unités IKK qui active la kinase. Lorsque l'activité de la kinase est à son plus haut potentiel, il peut y avoir un peu ou pas du tout de phosphorylation au niveau du C terminal. IKK activée peut donc phosphoryler ses substrats mais peut également phosphoryler ses propres régions C-terminales afin d'induire un changement de conformation qui va affaiblir le signal entre le motif HLH et le domaine kinase induisant un déclin général de l'activité kinase. Dans cette phase, IKK est rendue plus sensible aux autres déphosphorylations et inactivations médiées par les phosphatases. (D'après Hacker, H., & Karin, M. 2006)

I.3.2 a IKK α

IKK α , appelée également IKK1 peut être retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme alors que pour IKK β est exclusivement au niveau du cytoplasme. Du fait de sa présence dans le noyau mais également dans le cytoplasme, IKK α contribue à la régulation du cycle cellulaire, à la différenciation des cellules, à l'apoptose et également à la progression des tumeurs lors du processus de métastase (*Anest, V et al.2003 ; Yamamoto, Y et al.2003 ; Sil, A. K et al.2004*). Les souris déficientes pour IKK α ont une altération majeure au niveau de l'épiderme, se traduisant par une hyper prolifération incontrôlée des kératinocytes (*Hu, Y et al.1999 ; Takeda et al.1999 ; Li et al.1999*). Concernant le rôle de IKK α dans le contexte nucléaire, IKK α participe à la régulation moléculaire de la transcription des gènes sous influence de NF- κ B, elle possède également un rôle dans la régulation de la transcription de gènes liés à NF- κ B mais dans un contexte indépendant en ciblant directement des facteurs de transcription (*Huang, W. C., & Hung, M. C. 2013*). IKK α nucléaire est également capable de cibler p53 et p73 afin de déclencher le processus d'apoptose. Dans le noyau, IKK α est lié à l'arrêt du cycle cellulaire en transition G1/S par le fait d'augmenter l'activité de smad facilitant ainsi la dégradation protéosomale par la cycline D1 et l'expression du FGF (Fibroblast Growth Factor). IKK α nucléaire peut aussi promouvoir la progression du cycle cellulaire en G2/M en augmentant l'activité de la kinase Aurora A et en dé-réprimant l'expression du gène 14-3-3 σ afin de protéger l'ADN et les méthylations d'histones sur le promoteur. Enfin, IKK α a un impact dans la progression tumorale via l'augmentation du signal NF- κ B, la transcription des gènes dépendants de Notch et en supprimant l'expression médiée par FOXA2. En stimulant l'activité transcriptionnelle de STAT3 et smad tout en supprimant l'expression de maspin, IKK α nucléaire contribue au développement de métastases.

I.3.2 b IKK β

IKK α et IKK β peuvent être décrits comme biologiquement et structurellement similaires dans le complexe IKK. Cependant, ils n'ont pas de rôles physiologiques identiques et peuvent différer au niveau de leurs fonctions moléculaires exercées en dehors de ce complexe IKK. IKK β ou IKK2 est la protéine responsable de la phosphorylation de l'inhibiteur. Les travaux de Li et al. (*Li, Z. W et al.1999*) ont montré que les souris déficientes pour IKK β meurent à mi-gestation à cause de phénomènes d'apoptose incontrôlés dans le foie, phénotype retrouvé chez des souris déficientes pour les sous-unités RelA(p65) et NF κ B1 (p50/p105). Les souris déficientes pour IKK β ne sont plus capables d'activer le complexe IKK ainsi que le signal NF- κ B de façon générale en réponse aux stimuli via le TNF α ou l'IL-1. Cependant, seul IKK β joue un rôle majeur dans l'activation du complexe IKK et l'induction de l'activité NF- κ B. En effet, si IKK β est absente, la sous-unité IKK α ne répond plus aux signaux d'activation du complexe IKK.

I.3.2 c IKK γ

IKK γ ou NEMO, est un composé majeur du complexe IKK essentiel au bon fonctionnement et à la bonne activation de la voie NF- κ B (Shifera, A. S. 2010). Les travaux de Li et al. (Li, X. H., Fang, X., & Gaynor, R. B. 2001) ont montré que IKK γ est capable de recruter les autres sous-unités IKK afin de former un complexe de haut poids moléculaire. L'assemblage du complexe IKK par IKK γ est médiée par son interaction avec IKK β , et le recrutement d'IKK β peut se faire indépendamment de son activité kinase. En revanche le domaine N-terminal d'IKK β est requis pour le bon assemblage de ce complexe. Enfin, le rôle de IKK γ est prépondérant pour stimuler l'activité kinase de IKK β .

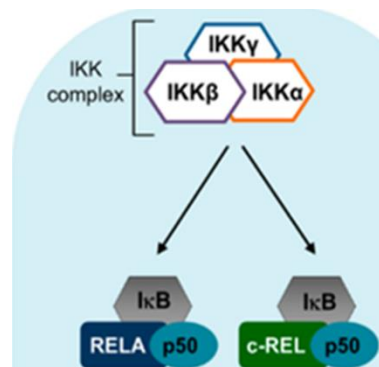


Figure 23. Représentation schématique du complexe IKK de la voie canonique/classique NF κ B (Adapté de Kennedy et al.2018).

Le complexe IKK est composé de IKK γ , IKK β et IKK α en amont et en aval I κ β responsable de l'inhibition des dimères RelA p50 et c-Rel p50 de la voie canonique NF- κ B.

Ensemble, IKK α , IKK β et IKK γ forment le complexe IKK (Figure 23) jouant un rôle central dans l'activation du facteur NF- κ B (Courtois, G. 2002). Dans la plupart des cellules, les dimères NF κ B sont retenus au cytoplasme par des interactions médiées par les protéines inhibitrices I κ β . Ces protéines inhibitrices I κ β se lient au domaine RHD (Rel Homology Domains) qui assure les propriétés de dimérisation, de signal d'export nucléaire, et de liaison à l'ADN des protéines REL/NF κ B (Beg, A. A., & Baldwin Jr, A. S.1993 ; Gilmore, T. D., & Morin, P. J. 1993 ; Baldwin Jr, A. S. 1996). En réponse à un stimulus via des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF), les LPS et TPA (phorbol ester), les sous-unités IKK α et IKK β subissent une autophosphorylation rapide, les rendant actives et capables de phosphoryler les inhibiteurs I κ B. Ces derniers sont polyubiquitinylés et dégradés via le protéasome 26S (Alkalay, I et al. 1995 ; Brockman, J. A et al. 1995 ; Brown, K et al. 1995 ; Chen, Z et al 1995 ; DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. 1995 ; DiDonato, J et al. 1996 ; Traenckner, E. M et al. 1995 ; Whiteside, S. T et al. 1995). Ce phénomène induit alors la libération des dimères NF- κ B pouvant ainsi transloquer au noyau pour aller activer la transcription de gènes cibles situés en aval.

I.3.3 IκBα

IκBα (Figure 24) fait partie de la famille des protéines IκB et possède la capacité de transloquer du cytoplasme au noyau et vice versa. Elle se situe donc à la fois dans ces deux compartiments mais cette distribution intracellulaire se fait sous forme dynamique (Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., & Miyamoto, S. 2000).

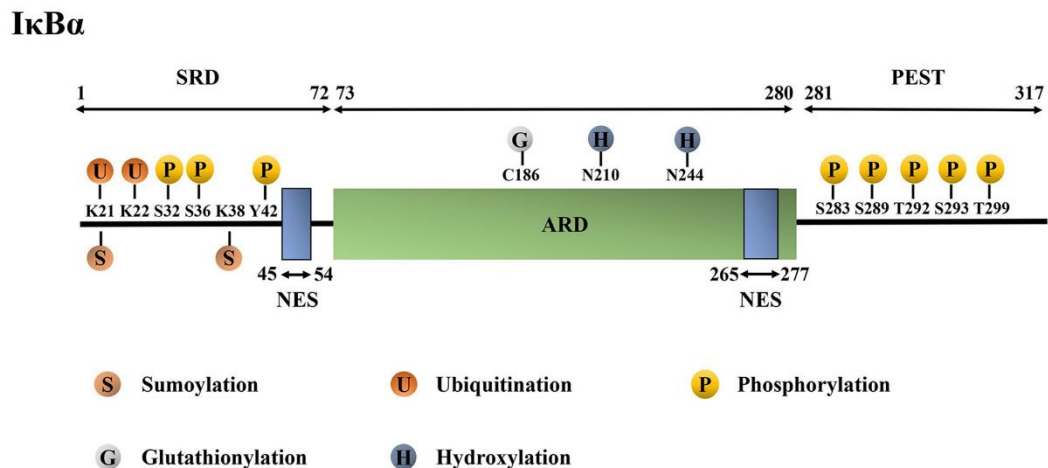


Figure 24. **Structure et modifications post-transcriptionnelles de la protéine humaine IκBα**

IκBα, nuclear factor-kappa B inhibitor alpha; SRD, signal-receiving domain; ARD, ankyrin repeat domain; PEST domain, proline–glutamic–serine–threonine domain; NES, nuclear export sequence; K, Lys, lysine; S, Ser, serine; Y, Tyr, tyrosine; C, Cys, cysteine; N, Asn, asparagine; T, Thr, threonine (D'après Wang et al. 2020)

La protéine IκBα est composée de trois régions majeures, un domaine N terminal de 70 acides aminés où a lieu la phosphorylation et l'ubiquitinylation, un domaine ARD fait de répétition d'ankyrines d'environ 220 acides aminés et d'une séquence C-Terminale PEST des résidus 275 à 317. Lorsque la cellule n'est pas stimulée, le domaine ARD de IκBα est associé aux domaines RHD des dimères NF-κB formant ainsi un complexe trimérique retenu dans le cytoplasme. Quand la cellule reçoit un stimulus, IκBα subit des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations et des ubiquitinylations conduisant à sa dégradation par le protéasome. Le signal NLS (Nuclear Localisation Signal) situé dans le RHD est démasqué et reconnu par l'importine α/β. Cette liaison forme un complexe qui est acheminé vers le noyau grâce au NPC (Nuclear Pore Complex), initiant la transcription des gènes cibles (Turpin, P., Hay, R. T., & Dargemont, C. 1999 ; Lee, S. H., & Hannink, M. 2002). Parce que IκBα est également un gène cible de NF-κB, il est rapidement reconstitué lorsque la voie NF-κB est activée. Par conséquent la sous-unité IκBα néo-synthétisée entre dans le noyau et transloque les dimères NF-κB vers le cytoplasme (Turpin et al. 1999 ; Chen, L. F., & Greene, W. C. 2004).

I.3.4 RelA ou p65

La sous-unité RelA ou p65 (Figure 25) constitue l'une des sous-unités NF- κ B majoritaire. Elle est composée d'un domaine RHD (Rel Homology Domain), de deux domaines de transactivation appelés TAD1 et TAD2.



Figure 25. **Représentation schématique de la sous-unité RelA (p65) (D'après Perkins, N. D. 2012)**

L'hétérodimère p50/RelA (p65) représente la forme la plus abondante de dimères de la famille NF κ B retrouvé dans la quasi-totalité des cellules. Les complexes p65/p65, p65/c-Rel, p65/p52, c-Rel/c-Rel, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p50/p50, RelB/p50, et RelB/p52 ont également été décrits mais certaines de ces combinaisons ne sont retrouvées que dans une proportion moindre de sous-type cellulaire (Hayden, M. S., & Ghosh, S. 2004). Ainsi, les protéines de la famille NF κ B/REL peuvent former jusqu'à 15 dimères différents. Différentes approches de modèles mathématiques et combinatoires ont montré l'existence de ces différentes possibilités d'association, cependant la pertinence biologique de toutes les associations de dimères possibles n'a pas encore été démontré. RelB est uniquement retrouvée en association avec p50 ou p52 (Ryseck, R. P et al.1992 ; Dobrzanski, P., Ryseck, R. P., & Bravo, R. 1994). Enfin, le dimère c-Rel/p50 représente le composé primaire d'une activation constitutive de NF- κ B dans les cellules B matures (Grumont et al. 1994b; Miyamoto et al. 1994).

En contexte physiologique dans la cellule B, RelA va contribuer à la prolifération des LB ainsi qu'au « switch » isotypique (Doi, T. S et al. 1997). Dans un contexte de stimulation via le TNF, RelA va jouer un rôle anti-apoptotique dans les cellules dendritiques et les macrophages (Beg, A. A., & Baltimore, D. 1996). De plus, RelA joue un rôle clé dans la biologie des cellules T régulatrices en favorisant la génération de leur phénotype ainsi que la maintenance de leur identité. (Ronin, E et al.2019). La sous-unité RelA est également impliquée dans le maintien de la senescence cellulaire par son activité régulatrice qui va moduler la stabilité génomique ainsi que les processus de réparation de l'ADN (Wang, J et al. 2009). A noter qu'en association avec la sous-unité c-Rel, RelA participe à la survie des B transitionnels 2 et des B matures (Grossmann, M et al. 2000) et ils sont tous les deux requis pour la différenciation des érythrocytes et des monocytes.

I.3.5 c-Rel

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous intéressons à la voie de signalisation canonique/classique NF- κ B et en particulier de la sous-unité activatrice c-Rel NF- κ B.



Figure 26. Représentation schématique de la sous-unité REL

REL est composé d'un domaine d'homologie appelé RHD et de 2 domaines de transactivation TAD1 et TAD2 ((Perkins, N. D. 2012)

La sous unité c-Rel (Figure 26) est codée par le gène REL situé dans la région 2p16 du chromosome 2. 587 acides aminés composent la protéine c-Rel pour un poids moléculaire d'environ 65 KDa (*Brownell et al. 1985*). Le gène REL est composé de 10 exons. c-Rel assure la prolifération et la survie des lymphocytes B issus du centre germinatif (GC Germinal Center) (*Gilmore et Gerondakis, 2011*). c-Rel est constitué de : un domaine d'homologie RHD (Rel Homology Domain), d'un signal de localisation nucléaire (NLS Nuclear Localization Signal), d'un domaine d'inhibition RID (Rel Inhibitory Domain) et enfin d'un domaine de transactivation TAD (Transactivation Domain). De plus, REL a été décrit dans la littérature comme étant l'homologue du gène v-Rel aviaire (Avian Reticuloendotheliosis) (Figure 27) possédant un fort pouvoir oncogénique. Des études ont montré que v-Rel pouvait induire rapidement des tumeurs lymphoïdes et avait la capacité de transformer différents types de cellules aviaires in vitro (*Gilmore et al. 1999 ; Kralova, J et al. 1994*).

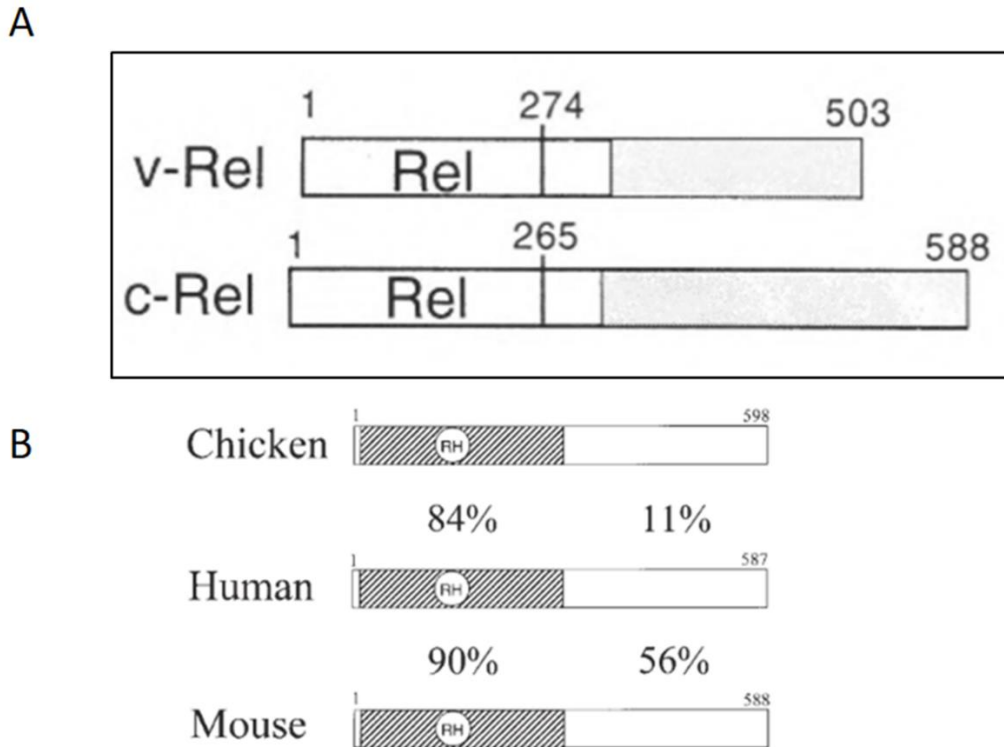


Figure 27. Représentation schématique de l'homologue aviaire v-Rel et c-Rel ainsi que le pourcentage d'identité en composition d'acides aminés.

A) Représentation schématique des homologues v-Rel et c-Rel. **B)** Pourcentage d'identité en composition en acides aminés entre le poulet, la souris et l'Homme de la séquence c-Rel dans le domaine RHD (Rel Homology Domain) et dans les séquences c-Terminales de ce même domaine RHD (Adapté de Gilmore et al. 1999)

Il existe également un variant d'expression de REL (Figure 28), $\Delta 9$ REL, dont l'expression a majoritairement été retrouvée dans des tumeurs DLBCL (Leeman et al. 2008). La délétion de l'exon 9, entraîne une perte de RID conduisant à une activité de transactivation plus importante.

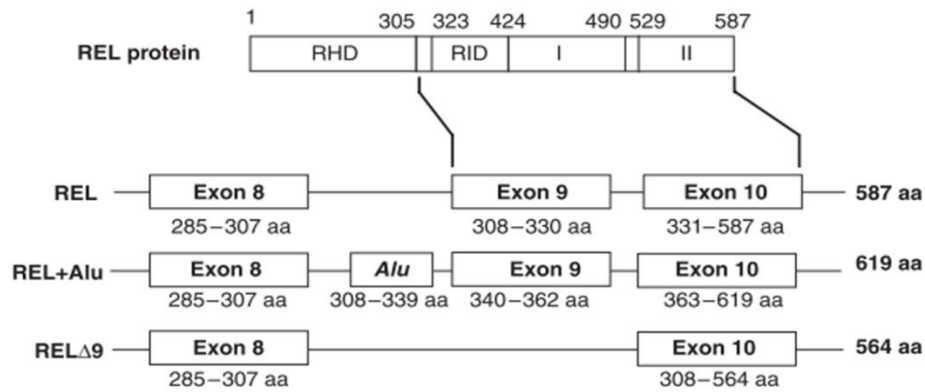


Figure 28. Variants d'épissage du gène REL retrouvés dans des cellules de lymphomes humaines et lymphocytes primaires

Représentation schématique de la protéine REL WT en haut et les exons utilisés pour générer trois ARNm REL retrouvés dans des lignées humaines de lymphomes. L'agencement des exons ainsi que la séquence en acides aminés codés pour chaque isoforme sont indiqués (RHD, Rel homology domain; RID, REL inhibitory domain; I and II, transactivation subdomains I and II). (D'après Leeman et al.2008).

c-Rel possède de nombreux gènes cibles impliqués dans des fonctions de prolifération/croissance avec c-Myc (Grumont et al.2004 ; Li et al.2020), survie et apoptose avec Bcl-XL (Chen et al.2000), et adhésion cellulaire avec la Selectine (De Siervi, et al.2009). De même, c-Rel est un acteur majeur de la réponse immune et des mécanismes de réparation de l'ADN (Gilmore et Gerondakis 2011). Dans le cadre de cette réponse immune, les gènes pouvant être cités sont Gamma I (Kaku et al.2002), TNF α (Bunting et al.2007), ou encore FOXP3 (Son et al.2011) ou CD40L (Pham et al.2005) par exemple. De plus, c-Rel possède des gènes cibles en lien avec la réparation de l'ADN comme la Claspine (Kenneth et al.2010) à titre d'exemple. Les nombreux rôles, fonctions (Figure 29) et gènes cibles sont détaillés dans la revue complète de Gilmore et Gerondakis (pour revue Gilmore and Geronakis 2011).

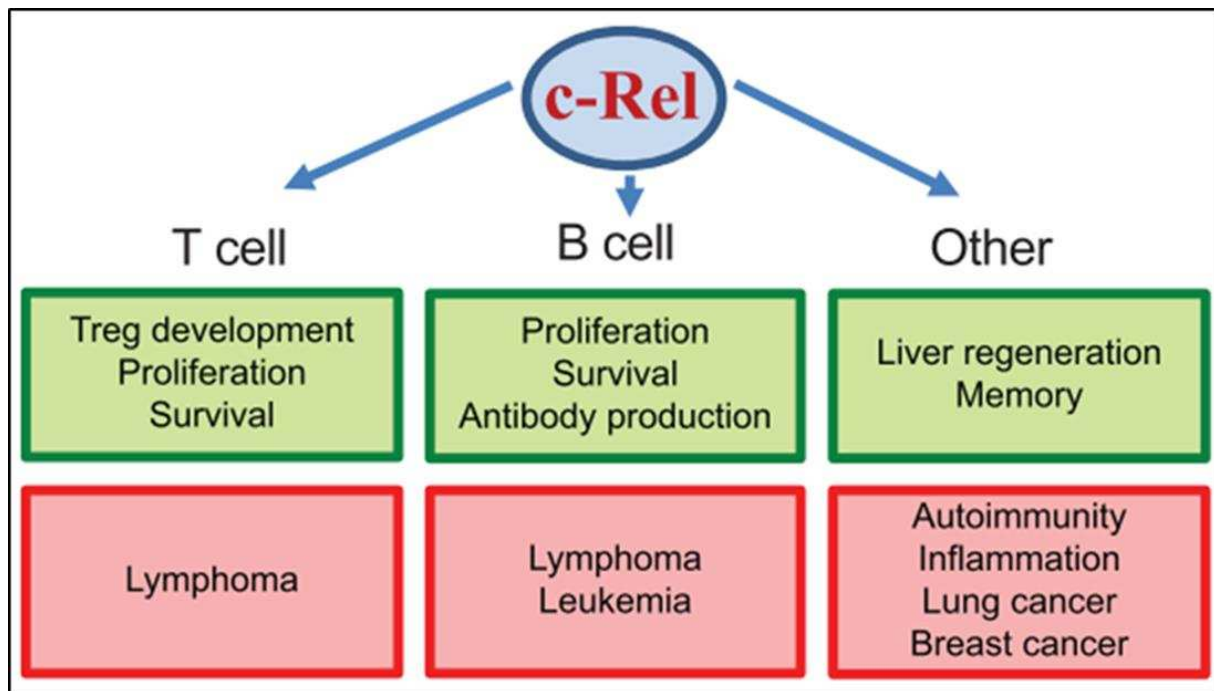


Figure 29. **Cellules cibles et fonctions de c-Rel**

Fonctions de c-Rel en conditions physiologiques de développement (vert) et pathologiques (rouge). c-Rel joue un rôle à la fois dans les cellules T, les cellules B et certains autres types cellulaires (D'après Gilmore and Gerondakis 2011)

La sous-unité c-Rel peut être inhibée de différentes façons, en agissant sur la translocation nucléaire, l'expression propre de la protéine c-Rel ou alors la force d'interaction avec l'ADN. En ce qui concerne la translocation nucléaire trois composés inhibiteurs majeurs ont été développés : STA-5326 (Keino et al.2008), FK 506 (Sen et al.1995, Cha-Molstad et al.2007) et PIN (Fan et al.2009). L'expression de la protéine c-Rel peut être inhibée avec la technique classique de siRNA (Small Inhibiting RNA) comme dans les travaux de Tian et Liou (Tian and Liou 2009). De plus, la pentoxifyline peut inhiber l'expression de c-Rel induite par l'anti CD3 dans les cellules T comme le montre les travaux de Wang et al (Wang et al.1997). Enfin, les composés quinoïdes peuvent moduler les interactions de liaison à l'ADN de c-Rel conduisant ainsi à l'inhibition de son activité (Liang et al.2006).

Le rôle de la sous unité c-Rel a également pu être étudié et approfondi grâce à de nombreux modèles murins de knock out (KO) (Carrasco et al 1994, Köntgen et al 1995, Hsiou-Liou et Hsia 2003, Gerondakis et al 2006, Hunter et Perkins 2016).

c-Rel possède un rôle clé physiologique dans le centre germinatif (Germinal Center GC). Les centres germinatifs sont des structures clés de l'expansion clonale des cellules B ainsi que de la maturation de leur affinité. C'est dans les GC qu'ont lieu les processus de sélection Darwiniens de diversification somatique et de sélection des immunoglobulines basée sur leur affinité dans le but de produire des anticorps de haute affinité afin de garantir une bonne

réponse immune humorale. (Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. 2022). Le chapitre 2 du manuscrit exposera plus en détail le rôle prépondérant de c-Rel dans le développement B, en particulier dans le GC. En effet, un modèle murin de knock out c-Rel a démontré des défauts lors de la formation des GC (Pohl et al.2002). Les phénotypes des souris c-Rel KO ont également révélé la part importante de cette sous-unité NF- κ B dans la prolifération, la survie et l'expression des anticorps pour les cellules B (Gerondakis et Siebenlist 2010) mais également son implication dans la prolifération des cellules T (T cells) et la génération de cytokines (Grigoriadis et al.1996, Gerondakis et al.1996). De la même façon, les souris c-Rel^{-/-} possèdent seulement 15% de lymphocytes T régulateurs (Treg) normaux dans le thymus (Isomura et al.2009). De plus, dans les cellules B activées grâce au BCR (B cell receptor), c-Rel joue un rôle dans la transition G0/G1 (Grumont et al.1998). Enfin, c-Rel est impliqué dans la croissance des cellules durant la phase G1 grâce à une boucle de régulation positive de la transcription de l'oncogène c-Myc (Grumont et al.2002).

Cependant, en conditions physiologiques, c-Rel n'est pas indispensable pour la lymphopoïèse et l'hématopoïèse (Gerondakis et al.2006).

L'étude de c-Rel dans un contexte pathologique apporte également de nombreux éléments de compréhension concernant ses fonctions. En plus de son implication dans de nombreuses fonctions physiologiques, la sous unité c-Rel a pu être étudiée dans des contextes de pathologies humaines. En effet, il a été observé des polymorphismes SNP (single nucleotide polymorphisms) dans le locus REL (Gilmore et Gerondakis 2011). Ces SNPs sont alors à l'origine de pathologies comme des cancers ou bien des maladies auto-immunes humaines comme la polyarthrite rhumatoïde (Gregersen et al.2009), le psoriasis (Strange et al.2010) mais également les lymphomes B (Enciso-Mora et al. 2010). Dans le cas des cancers, c-Rel peut inhiber la croissance et l'expression de gènes pro apoptotiques conduisant à un défaut du cycle cellulaire et l'apparition de malignités via ses interactions avec Δ Np63 α et Tap73 (Yang et al. 2011, Lu et al.2011). Pour les cancers du sein, l'addition d'une dérégulation des récepteurs à l'œstrogène et une surexpression de c-Rel promeut l'expression de la cycline D1. Ce phénomène, associé à une réduction de l'expression de p27, lève le blocage du cycle cellulaire et conduit à une prolifération aberrante des cellules (Belguise et Sonenshein 2007). Dans un modèle d'étude de kératinocytes humains (Lorenz et al.2014), la dérégulation de c-Rel affecte la progression du cycle cellulaire en : augmentant l'apoptose et en induisant un délai entre la phase G2/M avec des aberrations au niveau de la formation des fuseaux mitotiques. c-Rel peut également promouvoir l'invasion d'un tissu par les cellules cancéreuses comme l'ont montré Sekiya et al (Sekiya et al.2017) dans une étude sur les capacités invasives des cellules de choriocarcinome via la voie de signalisation PI3K/AKT. De plus, certains modèles d'études de maladie inflammatoire comme l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) ont démontré un rôle de c-Rel dans cette pathologie. En effet, les souris KO c-Rel dans ce modèle étaient protégées du développement de l'IBD car elles ne pouvaient pas produire d'IL23, une cytokine importante pour le développement de la maladie (Wang et al.2008). Concernant certaines affections respiratoires comme l'asthme, Donovan et al (Donovan et al.1999) ont montré que les souris c-Rel KO n'induisaient pas d'inflammation pulmonaire après exposition à l'ovalbumine, un puissant aérosol induisant des maladies pulmonaires. En 2004, une étude bioinformatique a décrit c-Rel comme un facteur de transcription important dans le phénomène de consolidation de la mémoire à long terme (long term memory LTM) (Levenson et al. 2004).

En outre, c-Rel est essentiel à la réponse du foie en cas de blessure afin d'assurer une bonne cicatrisation et régénération des tissus (*Gielsing et al. 2010*). Enfin, des travaux récents ont montré que c-Rel était impliqué dans le développement d'hypertrophie cardiaque et de fibrose en agissant sur la régulation de l'expression de Mef2A (myocyte enhancer factor 2A) et GATA4, deux régulateurs transcriptionnels de l'hypertrophie (*Gaspar-Pereira et al. 2012*). L'étude de la sous-unité c-Rel dans les Lymphomes et en particulier les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules du Centre Germinatif (Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma, GCB-DLBCL) feront l'objet d'une partie plus développée dans le chapitre 3 de mon manuscrit.

I.3.6 Sous unité p50

La sous-unité p50 de la voie canonique/classique NF- κ B (Figure 30) a pour précurseur p105. P50, également appelée gène NF κ B1 n'a pas d'activité transcriptionnelle propre. NF κ B1 est localisée chez l'Homme sur le chromosome 4q24 et code la protéine p105. p50 correspond à la partie N terminale de p105 contenant le RHD (REL Homology Domain). Dans la littérature, p50 est générée par l'élimination de la séquence consensus en C-Terminal de p105 par le protéasome 26S (*Lin, L., DeMartino, G. N., & Greene, W. C. 1998*). Une fois p105 clivée, p50 possède le domaine de liaison à l'ADN et doit alors former un dimère avec RelA, RelB ou c-Rel pour pouvoir agir en tant que facteur de transcription. L'homodimère p50 peut également recruter un coactivateur Bcl-3, membre de la famille I κ B (*Perkins, N. D. 2007 ; Massoumi, R et al. 2006*). Des études ont montré que Bcl-3 possède un rôle dans l'inhibition de la liaison des homodimères p50 NF- κ B et de son homologue p52. La phosphorylation médiée par Bcl-3 peut inactiver partiellement cette propriété inhibitrice de p50. p50 est également impliquée dans la survie des cellules B qui ne sont pas encore activées (*Grumont, R et al. 1998*) et requis dans l'activation des B (*William, C. S., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., & Baltimore, D. 1995*).



Figure 30. Représentation schématique de la sous-unité P50 NF κ B1

La sous-unité p50 possède comme c-Rel, un domaine d'homologie REL RDH pour Rel Homology Domain

I.4. Fonctions clés de la voie NF- κ B canonique/classique

La voie NF- κ B canonique possède un rôle dans les deux types de réponses immunitaires, innée et adaptative (pour revue Bonizzi, G., & Karin, M. 2004) (Figure 31). Premièrement, il a été montré qu'en cas de déficience RelA et IKK β sur des modèles de souris, cela les rendaient plus susceptibles aux infections. (Alcamo, E et al.2001 ; Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V., & Karin, M. 2001).

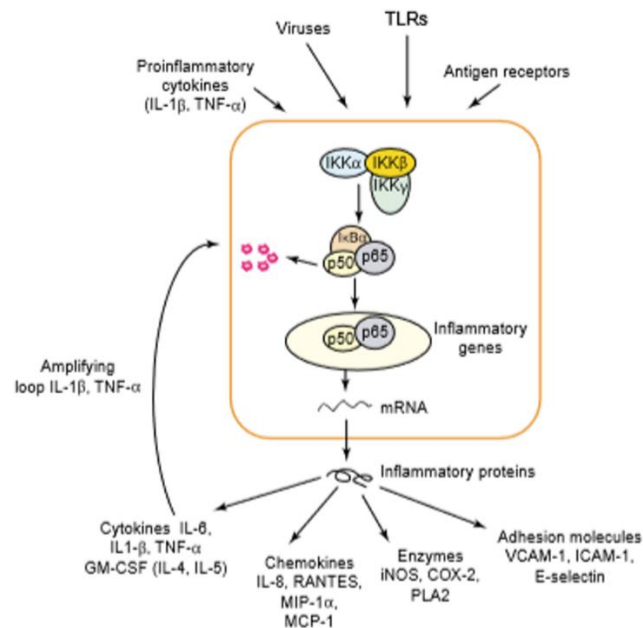


Figure 31. Stimuli et fonctions de la voie classique/canonique NF κ B dans la réponse immune

La voie NF- κ B est activée par une variété de signaux inflammatoires, entraînant l'expression simultanée de multiples gènes de la réponse inflammatoire et immune comme les cytokines, les chemokines, certaines enzymes et molécules responsables de l'adhésion cellulaire. Les cytokines pro inflammatoires IL-1 β et TNF α vont activer NF κ B formant une boucle d'amplification de la transduction du signal. (D'après Bonizzi, G., & Karin, M. 2004)

La plupart des revues de la littérature mentionnent l'implication de la voie classique/canonique NF- κ B dans l'inflammation via COX2, NOX, TNF ou encore l'IL-6 ; dans l'immunité innée via la sécrétion de cytokines, chemokines, protéases et molécules de l'adhésion cellulaire ; et enfin dans la survie cellulaire en ciblant BCL-xL, cIAPs, GADD45 β , BFL1 et SOD2 (Karin, M., & Greten, F. R. 2005 ; Rahman, M. M., & McFadden, G. 2011).

Mais la voie de signalisation classique NF- κ B ne se limite pas à des fonctions pro-inflammatoires et immunitaires, elle peut également être impliquée dans le métabolisme cellulaire comme le montre les travaux de Capece et al. (Capece, D et al. 2022). NF- κ B est en effet capable de cibler des enzymes du métabolisme comme la 3PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase isoform), la GDH1 (glutamate dehydrogenase 1) et la

CES (carboxylesterase 1) qui sont des enzymes responsables de l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses.

Ainsi, la voie de signalisation canonique/classique NF- κ B est capable de contrôler de façon directe ou indirecte l'inflammation, la prolifération des cellules cancéreuses et leur survie, la transition épithélio-mésenchymateuse durant le développement embryonnaire et la régénération des tissus (Roche, J. 2018) ; les comportements invasifs de certaines cellules, l'angiogenèse et la formation de métastase. De même, NF- κ B peut induire certaines altérations génétiques et épigénétiques, favoriser la formation de cellules souches cancéreuses, optimiser leur métabolisme et leur conférer des propriétés de résistances aux thérapies. Enfin, l'activation de NF- κ B peut induire un processus d'immunosuppression par différents mécanismes (pour revue Taniguchi, K., & Karin, M. 2018).

Chapitre I. Partie 3 Voie alternative/non canonique NF- κ B

Concernant la voie alternative, elle mobilise RelB/p52 (Figure 32) et une kinase activatrice NIK (NF- κ B inducing kinase) qui phosphoryle IKK α . En fonction des voies d'activation, les récepteurs engagés ainsi que les stimuli diffèrent (Bonizzi et Karin 2004). Le précurseur de p52 est p100. Ce dernier sert à la fois de précurseur et d'inhibiteur spécifique de RelB (Sun, S. C. 2011). La voie alterne dépend du BAFFR (B cell activating factor receptor), du LT β R (lymphotoxin bêta receptor) et comme la voie classique, du CD40 (Kennedy et Klein 2018). Dans ce cas de figure, la kinase NIK va phosphoryler IKK α pour l'activer puis celle-ci phosphoryle les sérines situées dans la région C-terminale de p100 entraînant sa dégradation sélective. Cela induit la génération de p52 et par la suite la translocation nucléaire du dimère p52/RelB ou p50/RelB au noyau.

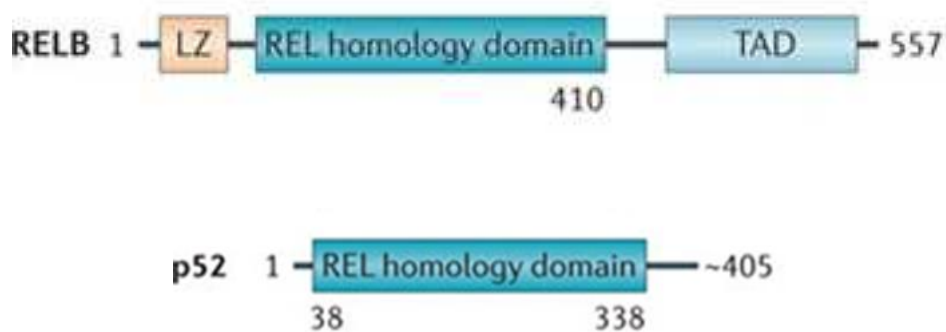


Figure 32. Représentation schématique de la sous-unité RelB et p52 de la voie alternative/non canonique NF κ B

REL B possède un motif en glissière à leucine ou leucine zipper (LZ), un domaine d'homologie RHD et un domaine de transactivation TAD. Concernant p52 elle ne possède que le domaine RHD sans TAD ni motif LZ.

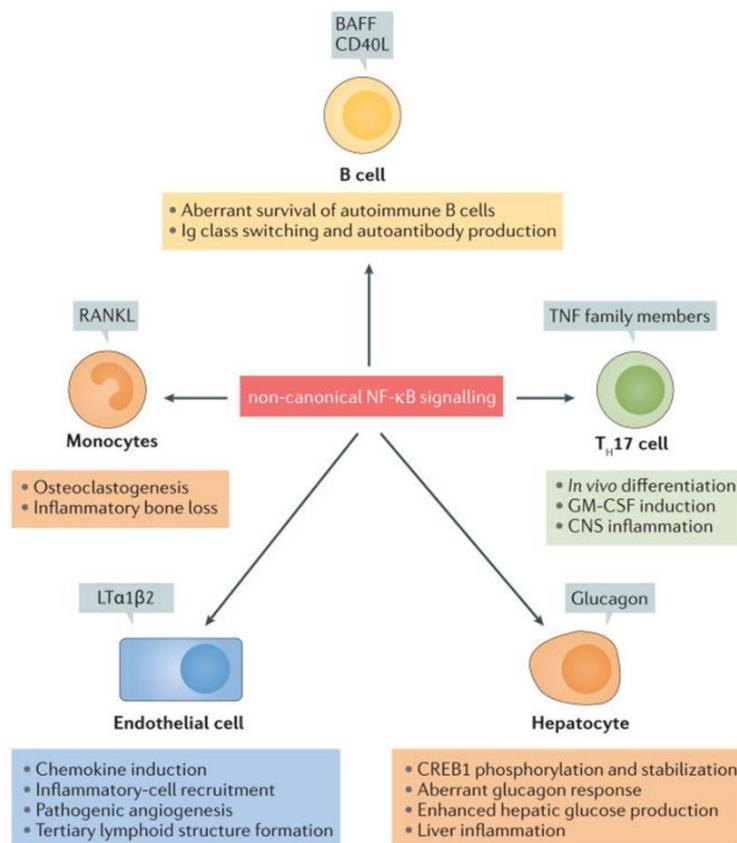


Figure 33. Fonctions de la voie alternatives non canoniques de NF- κ B en conditions physiologiques

NF- κ B alternative/non canonique est responsable de la médiation de la survie et de l'homéostasie des LB, de la génération et le bon fonctionnement des T helper (Th17), la différenciation des ostéoclastes à partir des monocytes, de la production de chemokines par les cellules endothéliales et la production de glucagon par les hépatocytes (pour revue Sun, S. C. 2017 ; Yu, J et al. 2014 ; Gardam, S et al.2008 ; Xie, P et al 2007 ; Dejardin, E. 2006 ; Novack, D. V. 2011 ; Li, Y et al. 2016 ; Majjer, K. I et al. 2015 ; Sheng, L. et al.2012)

Les spécificités de la voie non canonique/alternative reposent sur une transduction du signal plus lente mais persistante, dépendante de la synthèse de protéines, répondant à une petite partie de signaux médiés par les TNFR, et conduisant à des fonctions plus spécifiques que la voie classique. La voie non canonique NF- κ B est alors sollicitée pour l'organogenèse des tissus lymphoïdes, l'immunité adaptative, certaines propriétés anti-inflammatoires, la maturation des cellules B, et la formation des ostéoclastes (Gasparini et al.2014) (Figure 33). RelB est nécessaire pour la production d'Ig dans la situation d'une activation des LB à la fois dépendante et indépendante des LT (Weih, F., Warr, G., Yang, H., & Bravo, R. 1997). Cette sous-unité RelB est également requise pour le développement de la réponse adaptative médiée par les LT et le développement des cellules NK (Caamano, J et al.1999). Enfin, RelB est garant du bon développement des cellules thymiques et les cellules dendritiques de la rate (Wu, L. et al.1998) ainsi que la promotion des interactions entre LT et macrophages et l'activité cytotoxique des LT (Weih, F et al.1997).

Au travers de ce premier chapitre nous avons pu voir les deux types de réponse immunitaire adaptative et innée et également le rôle clé du LB via la voie de signalisation NF- κ B. Il est maintenant crucial de détailler le lien intime de cette voie de signalisation dans le contexte du développement B pour pouvoir mieux appréhender le contexte pathologique d'une activité aberrante de NF- κ B et ses conséquences.

Chapitre 2 Développement B et voie NF- κ B

Nous avons évoqué dans le chapitre 1 la signalisation de la voie NF- κ B de la cellule B lors du contexte physiologique d'une réponse immune. Nous avons mentionné le rôle central de certaines des sous-unités activatrices de la voie canonique comme RelA et c-Rel qui ont des fonctions importantes dans le développement et la maturation de la cellule B. Afin de mieux comprendre le contexte de ce projet de thèse, il est important de détailler le développement de la cellule B du stade médullaire au stade périphérique, tout en corrélant l'implication de NF- κ B à ce processus physiologique.

I. Développement B médullaire

Les premières études portant sur le développement des cellules B démarrent dans les années 1970 et 1980 notamment par le biais de l'utilisation de modèles murins (Good, R. A., & Zak, S. J. 1956). Des études sur des modèles de transplantation chez la souris ont permis de démontrer que les cellules qui dérivait de la moelle osseuse étaient responsables de la médiation de la réponse immune via les anticorps (Miller, J. P., & Mitchell, G. F. 1968 ; Mitchell, G., & Miller, J. F. A. P. 1968). A noter que la revue de LeBien et Tedder (LeBien, T. W., & Tedder, T. F. 2008) mentionne que le réarrangement fonctionnel des locus Ig, aussi bien chez l'Homme (LeBien, T. W. 2000) que chez la souris (Hardy, R. R., Kincade, P. W., & Dorshkind, K. 2007), est une condition sine qua non au devenir de la cellule B.

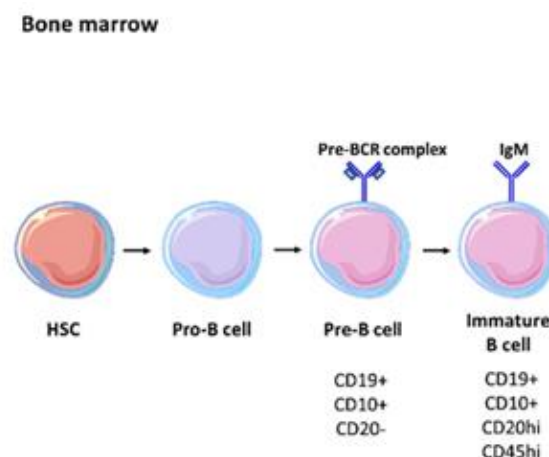


Figure 34. Focus sur les Stades du développement médullaires

Le développement de la cellule B commence dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique qui va ensuite passer au stade pro B puis Pre B avant d'effectuer une migration vers la circulation sanguine en tant que B transitionnels (Adapté d'après Patel, A. M et al. 2021)

I.1 Cellule Souche Hématopoïétique

La cellule Souche Hématopoïétique ou HSC (Hematopoietic Stem Cell) est définie comme une lignée cellulaire $\text{Lin}^- \text{B220}^- \text{KIT}^+ \text{SCA1}^+ \text{FLT3}(\text{fms-related tyrosine kinase 3})^- \text{CD34}^-$. C'est-à-dire une lignée cellulaire hématopoïétique capable de s'autorenouveler mais avec des potentiels de cellules progénitrices appelée MMP (Multipotential progenitors). Ces cellules MMP sont déficientes pour le marqueur de différenciation vers les erythro-mégakaryocytes mais elles conservent le potentiel de différenciation en cellules myéloïdes et lymphoïdes. Elles sont ainsi appelées LMPP (lymphoid-primed multipotential progenitors). Le sous-type $\text{Lin}^- \text{KIT}^{\text{low}} \text{SCA1}^{\text{low}} \text{IL-7R}^+$ va donner naissance aux cellules B et T mais pas aux cellules appartenant à la lignée myéloïde, mais elles constituent une population de progéniteurs Lymphoïdes Communs ou CLP (Common Lymphoid Progenitors) (*Nagasawa, T. 2006*). La lignée myéloïde va permettre de donner les sous-types granulocytes, monocytes, macrophages et les cellules dendritiques par le biais de la myélopoïèse dans la moelle osseuse (*De Kleer, I et al. 2014*). La lignée lymphoïde inclut les sous-types LT, LB et NK (*Kondo, M et al. 2003 ; Weissman, I. L. 2000*)

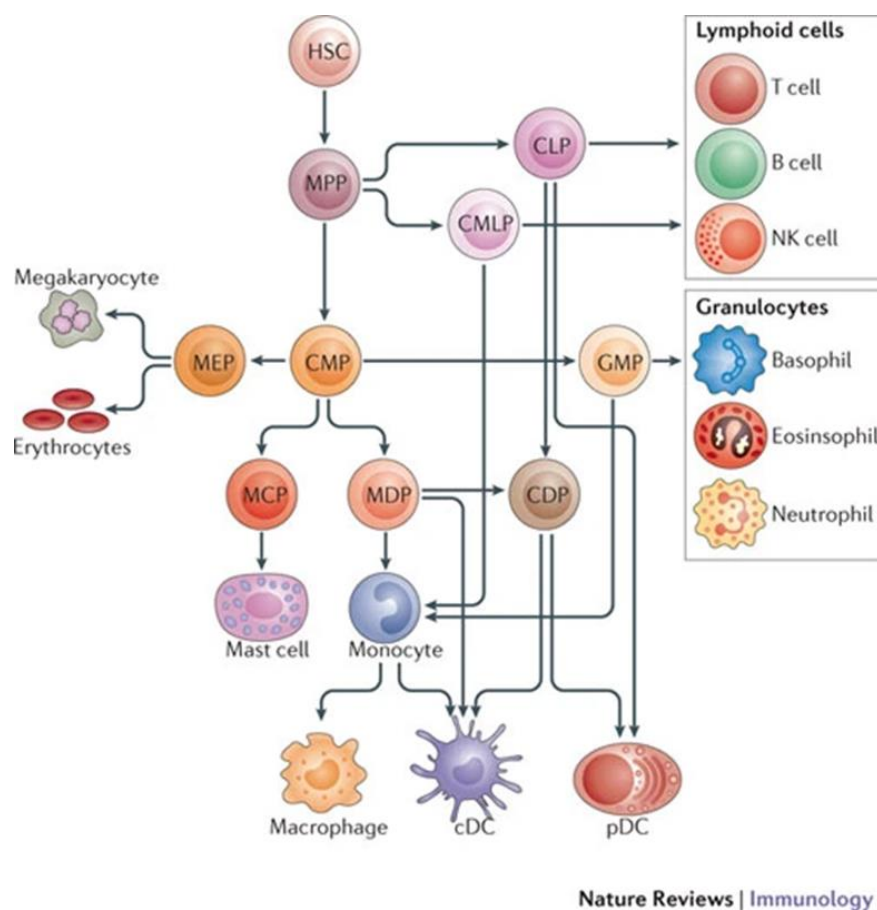


Figure 35. Différenciation myéloïde et lymphoïde à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Les cellules myéloïdes sont générées à partir d'une cellule souche hématopoïétique et de cellules pro génitrices MMP. La figure représente alors le réseau de cellules pro génitrices capables de donner naissance à l'ensemble des lignées de cellules souches hématopoïétiques. Les abréviations mentionnées sont les suivantes : cDC, conventional DC ; CDP, common DC progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; CMLP, common myelolymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; DC, dendritic cell; GMP, granulocyte and macrophage progenitor; MCP, mast cell progenitor; MDP, macrophage and DC progenitor; MEP, megakaryocyte and erythroid progenitor; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid DC (D'après Gabilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. 2012).

Les précurseurs des LB sont positifs pour le marqueur B220. Selon les capacités d'expression de différents marqueurs de différenciation, ces cellules B220+ peuvent alors être divisées en quatre sous-types cellulaires : les cellules pre-pro B, pro B et pre B qui seront détaillées dans la suite de cette partie 1 (Hardy, R. R et al.1991).

Comme mentionné dans le premier chapitre, la voie NF- κ B est intimement liée au développement des lymphocytes et en particulier de la cellule B. En 2018, Nakagawa et Rathinam (Nakagawa, M. M., & Rathinam, C. V. 2018) ont démontré que l'activation constitutive de la voie canonique NF- κ B dans les CSH entraîne une déplétion du pool de CSH, une pancytopenie et une mort prématurée. Cela est dû à l'activation constitutive de IKK2 ou IKK β dans ces mêmes CSH conduisant à leur quiescence. Les études mécanistiques ont montré une réduction des signaux de type TPO (thrombopoïétin (TPO)-mediated signals) et une régulation diminuée sur sa cible P57 due à l'expression réduite de c-MPL. A noter que la

voie TPO/c-MPL joue un rôle important dans la capacité d'auto-renouvellement et la quiescence des cellules souches leucémiques (Wang, N., & Zhu, H. Y. 2021). Les études moléculaires quant à elles montrent que Klf1 est un suppresseur clé de c-MLP dans les CSH présentant une forte activité NF-κB. Cette étude a donc permis d'identifier un mécanisme inconnu de la voie canonique NF-κB au niveau du stade CSH du développement B pouvant conduire à des processus pathologiques.

En outre, une revue de Espín-Palazón & Traver (Espín-Palazón, R., & Traver, D. 2016) expose l'implication de la voie NF-κB notamment dans l'embryogenèse, dans l'homéostasie et la différenciation des lignées hématopoïétiques et la génération des CSH. Lors du développement embryonnaire chez les vertébrés, de nombreux défauts en lien avec NF-κB ont pu être décelés dans : la morphogenèse de squelette ; développement des membres, du foie et de la peau ; développement neural, formation de la notochorde ; développement des poumons et des muscles et les capacités de différenciation spécifiques propres aux CSH. Ainsi, les acteurs spécifiques de NF-κB vont pouvoir être exprimés de manière différentielle dans les sous types de populations hématopoïétiques et cela va permettre de réguler à la fois la lymphopoïèse, l'érythropoïèse et la myélopoïèse (Figure 32) (Bottero, V., Withoff, S., & Verma, I. M. 2006 ; Denk, A., Wirth, T., & Baumann, B. 2000 ; Zhang, M. Y., Sun, S. C., Bell, L., & Miller, B. A. 1998 ; Grossmann, M., Nakamura, Y., Grumont, R., & Gerondakis, S. 1999)

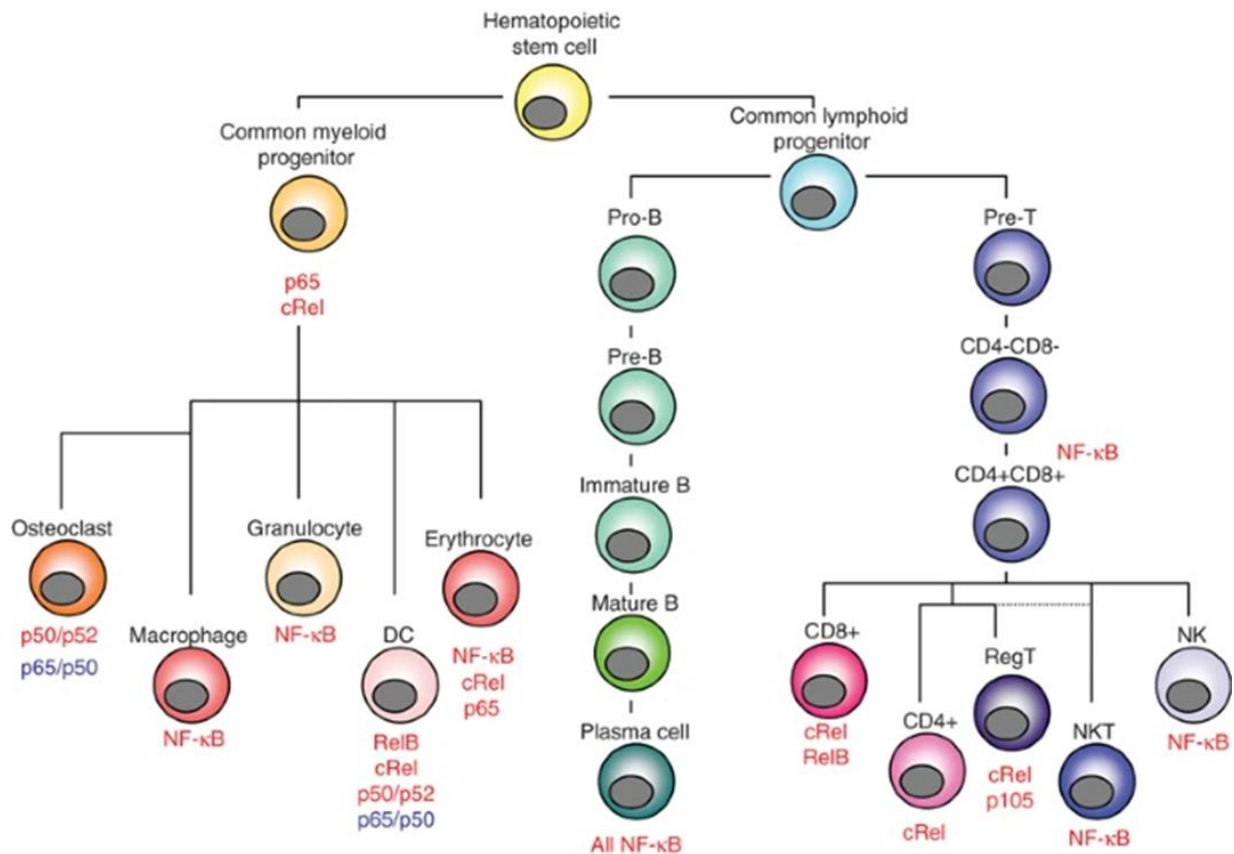


Figure 36. Voie NF-κB dans la différenciation hématopoïétique

L'expression de NF-κB est qualifiée de tissu spécifique et constitue donc un facteur de transcription crucial dans l'hématopoïèse. p65 et p50 sont des protéines ubiquitaires, les autres membres de NF-κB sont spécifiques à des sous-types cellulaires. Ainsi, l'expression de c-Rel est propre aux lymphocytes, monocytes, granulocytes et cellules érythroïdes. RelB de la voie non canonique/alternative est exprimée dans les cellules dendritiques et les lymphocytes. Quant à p52 elle est retrouvée au niveau de l'épithélium de l'estomac et les cellules dendritiques ainsi que les macrophages et les lymphocytes. C'est par le biais de différents modèles murins d'études qu'ont pu être caractérisés les mécanismes majeurs par lesquels NF-κB peut moduler la différenciation hématopoïétique. Sur la figure, la mention NF-κB indique que la sous-unité spécifique de la voie n'a pas encore été identifiée. (D'après Bottero, V., Withoff, S., & Verma, I. M. 2006).

NF-κB est garant du bon développement des précurseurs hématopoïétiques et leur survie ; joue un rôle clé dans les stades précoces de l'hématopoïèse, le développement des cellules T, la différenciation en progéniteur commun lymphoïde ou myéloïde (pour revue Gerondakis et al. 2012). Une étude démontre également que NF-κB va permettre de protéger les CSH via des signaux de survie (Yamashita, et al. 2016). Une autre étude montre que la délétion de RelA/p65 conduit à de nombreux défauts de fonction des CSH (Stein, S. J., & Baldwin, A. S. 2013). Enfin, nous pouvons citer une étude mettant en avant le rôle des signaux de type cohésine médiés par NF-κB dans le freinage de la capacité d'auto-renouvellement des CSH dans un contexte de vieillissement et d'inflammation (Chen et al. 2019).

I.2 Stades pre-pro B et pro B

L'engagement du progéniteur vers une différenciation B est rendu possible grâce à l'intervention de l'IL7Ra et de Pax 5 (*Burrows et al.2020*). Le premier stade de différenciation est le stade pre-pro B où les cellules sont B220 positives et possèdent les gènes relatifs aux Immunoglobulines en configuration germinale (*Allman, D., Li, J., & Hardy, R. R. 1999*). Une étude de single cell (*Morgan, D., & Tergaonkar, V. 2022*) a permis de mettre en lumière les différentes signatures transcriptomiques (chez l'Homme) associées aux différents stades de maturation B. Ainsi, au stade pre-pro B sont retrouvés les marqueurs suivants : CD34, CD38, la TdT évoquée dans le chapitre 1, CD179b, VpreB, CD10, IL7Ra, CD19, CD45/B220, CD43 et RAG1. Dans les cellules pre-pro B, des facteurs de transcriptions associés aux lignées myéloïdes sont également exprimés (RUNX2, IRF8, BST2 et TCF4) mais ceux-ci sont réprimés dès l'engagement vers le stade de différenciation suivant en pro B.

Le stade pro B est divisé en deux phases, on parle alors d'une phase précoce pro B ou « early pro B » puis d'une phase tardive ou « late pro B ». Les cellules pro B précoces sont alors CD34, CD38, CD24 et TdT positives. Elles possèdent également RAG2, EBF1, PAX5, SOX4, LEF1, RAG1, VpreB et IGLL1. Le stade pro B tardif possède les marqueurs listés précédemment avec en plus le CD179B, CD10 et IL7RA. SOX4 sert à produire les enzymes RAG1 et RAG2 indispensables pour la recombinaison VDJ au locus de la chaîne lourde, d'abord une recombinaison DH->JH (pro B précoce) puis VH-DJH (pro B tardif) (Figure 33). Enfin EBF1 va permettre de produire le VpreB pour la production de la chaîne légère de substitution.

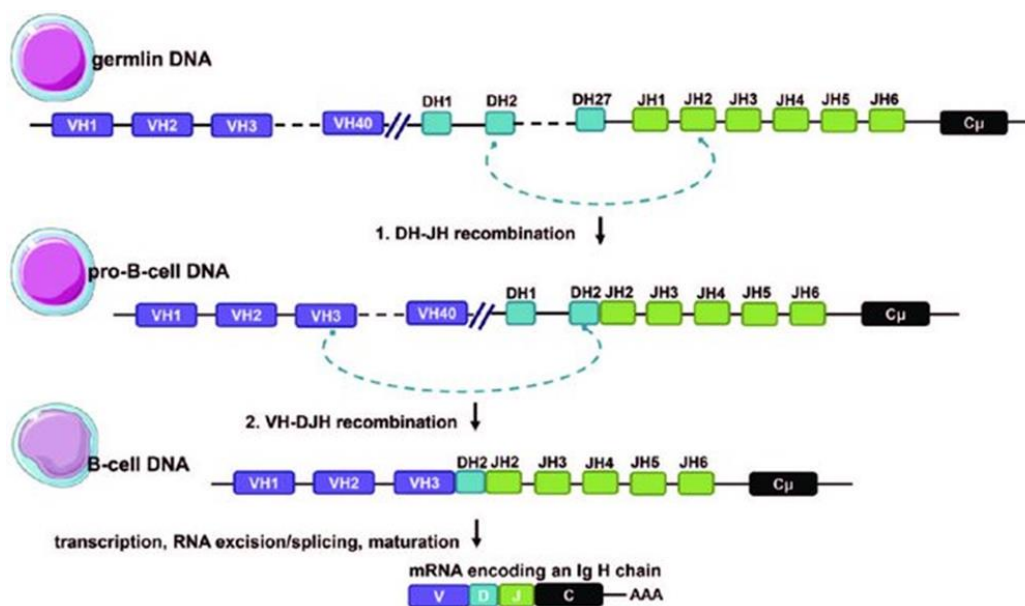


Figure 37. Schéma des réarrangements DH-JH puis VH-DJH aux stades de différenciation pro B puis pre B

Les réarrangements au niveau du locus de la chaîne H précèdent ceux de la chaîne L. Les réarrangements se font de manière séquentielle et conduisent dans un premier temps au réarrangement d'un segment DH avec un segment JH. Par la suite le segment VH est recombinaisonné avec ce réarrangement DJH. Malgré l'absence du domaine D, le principe de réarrangement des locus IG de la chaîne légère sont similaires à celui-ci. Les abréviations mentionnées sur le schéma sont les suivantes Ig H chain: immunoglobulin heavy chain, VH: heavy chain variable genes, DH: heavy chain diversity genes, JH: heavy chain joining genes, CH: heavy chain constant genes (D'après Aribi, M. 2020)

Concernant le lien entre ce stade pro B et la voie NF- κ B, une étude (Paun, A., Claudio, E., & Siebenlist, U. K. 2021) a démontré qu'une activation constitutive de la voie NF- κ B canonique et non canonique (modèle mb1^{DPWY}) lors des stades précoces de développement B (pre pro B, pro B précoces puis tardifs) va altérer le programme transcriptionnel et conduire à la perte des cellules B via l'apoptose (Figure 38).

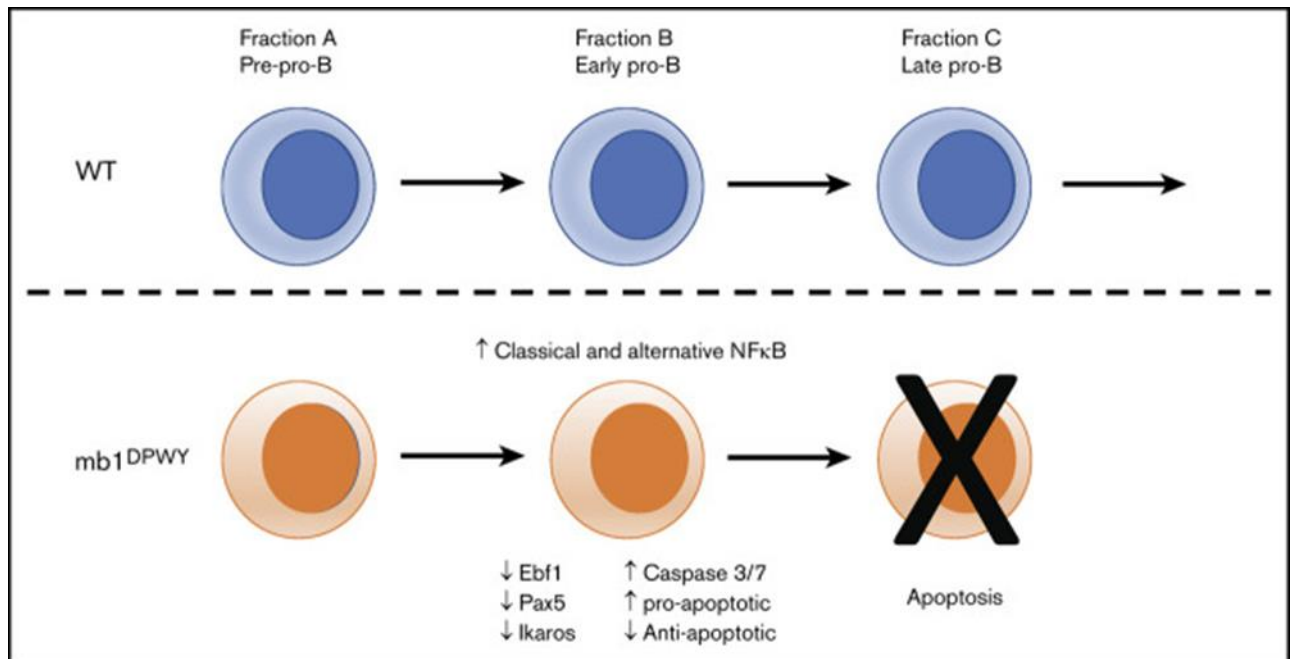


Figure 38. Conséquences de l'activation constitutive de NF- κ B lors des stades précoces de développement B

Une souris mb1^{DPWY} possède les deux voies NF- κ B constitutivement actives subit une perte des cellules B qui débute en stade pro B et cette perte est amplifiée au stade tardif pro B dû notamment à l'apoptose de ces cellules. Ce processus a lieu dans les cellules de façon autonome mais affecte de manière conséquente les caractéristiques phénotypiques des organes lymphoïdes secondaires et le niveau d'anticorps circulants. Cet effet est décrit comme temporaire car une activation similaire sous une Cre exprimée plus tard dans le développement B n'a pas entraîné la génération d'un phénotype comparable. (D'après Paun, A., Claudio, E., & Siebenlist, U. K. 2021).

I.3 Stade Pre B

Le stade suivant de la différenciation est appelé pre B, c'est à ce moment-là que l'acquisition d'un pre BCR a lieu. On parle de stade grand pre B puis petit pre B, c'est au moment du stade grand pre B que le pré-BCR est formé alors qu'au stade petit pre B a lieu le réarrangement DL->JL. Au niveau des marqueurs, on va retrouver CD34, CD38, CD24, CD19, IL7RA, IGH, CD43, RAG1, RAG2, SOX4, LEF1, EIF4EBP1, VpreB, CD79B, PAX5 et RSP27. Les recombinaisons VDJ de la chaîne lourde constituent un récepteur dit pré-BCR retrouvé au stade de développement grand pre B. Par la suite, la réexpression de SOX4 permet le réarrangement de la chaîne légère sur le segment VJ (VJ->JL) grâce aux recombinaisons RAG1/2 au stade petit pre B (Figure 35).

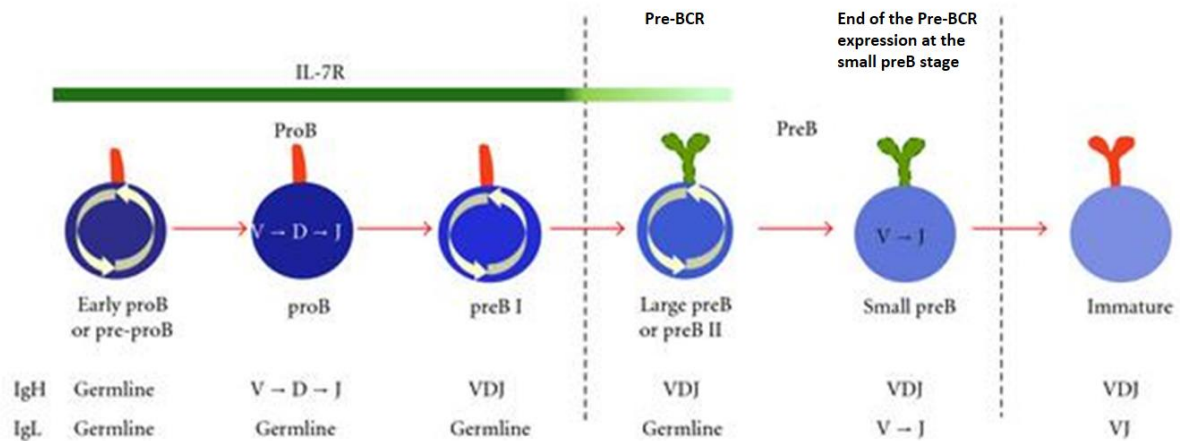


Figure 39. Stades de différenciation précoces de la cellule B

Les différents stades précoces de développement B sont caractérisés par le processus de recombinaison VDJ. Les chaînes lourdes IgH et légères IgL sont réarrangées aux stades pro B et pre B respectivement. Chaque étape est subdivisée selon l'assemblage séquentiel des segments VDJ. La réplication et la recombinaison sont des processus mutuellement exclusifs comme indiqué par les flèches circulaires et le signe VDJ à l'intérieur des cellules. Les lignes en pointillés séparent les stades pro B et pre B et indiquent le moment où les signalisations du pré BCR et du BCR sont requises pour effectuer la sélection positive et la progression de la cellule B aux autres stades de maturation. Les lignes continues indiquent les récepteurs clés qui vont contrôler chaque stade du développement B. Il existe des différences d'intensité concernant le signal IL7 indiqué en vert, soulignant que chaque sous-étape de différenciation a besoin d'une concentration plus ou moins abondante en ligand IL7R (Adapté d'après Pérez-Vera, P., Reyes-León, A., & Fuentes-Pananá, E. M. 2011)

Pour rappel, un pré-BCR est assemblé à partir de la chaîne lourde μ (μ H) et de la chaîne légère de substitution avec les molécules de signalisation Ig α et Ig β . La chaîne légère de substitution est composée de VpreB1/2 et λ 5 (Figure 40).

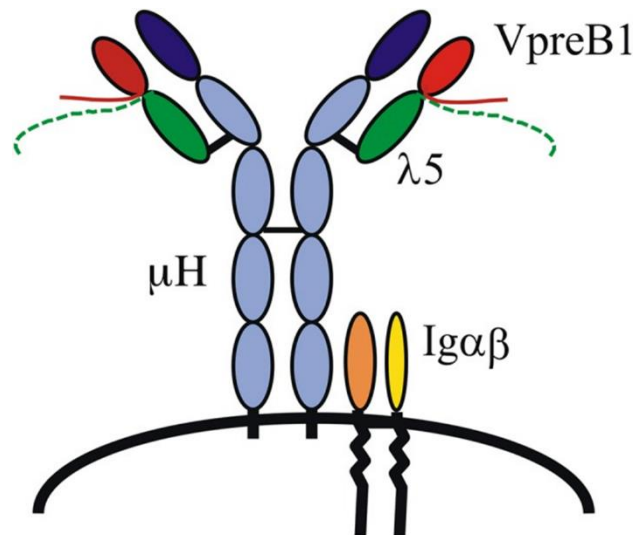


Figure 40. **Représentation schématique du Pre BCR** (D'après Winkler, T. H., & Mårtensson, I. L. 2018).

Sur le schéma est représenté un pré-BCR composé de l'anticorps (μH), des chaînes légères de substitution comprenant les molécules de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Les chaînes de substitution sont constituées de segments $VpreB1/2$ et $\lambda 5$ chacune contenant une région unique représentée par une queue dépassant de la molécule respective

La littérature qualifie le stade pre B comme un « checkpoint » important de la différenciation B (Figure 40). L'étude de Hendriks & Middendorp (Hendriks, R. W., & Middendorp, S. 2004) a démontré que le pré-BCR était capable d'induire une signalisation cellulaire de manière constitutive et sans intervention du ligand. Par conséquent les cibles en aval de la cascade du pré-BCR, comme SLP-65 et BTK, peuvent assurer la régulation de la prolifération des LB et exercer un pouvoir de suppresseur de tumeurs.

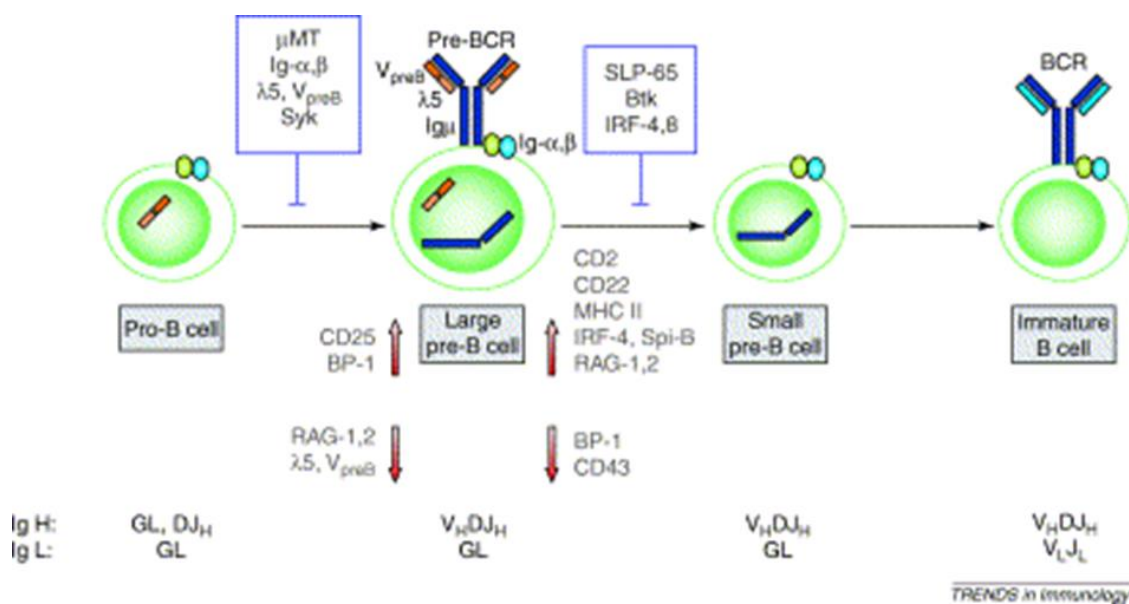


Figure 41. **Représentation schématique de la différenciation B chez la souris**

Les lignées cellulaires issues de la différenciation B peuvent être classifiées en 4 stades basés sur les statuts de réarrangement des loci Ig et l'expression d'un pré-BCR. Différents blocages exercés par l'inactivation ciblée des gènes sont indiqués en bleu. Les molécules qui sont up régulées ou down régulées au stade large pre B arrêtent le cycling et progressent en maturation pour devenir des small pre be sont indiqués en rouge. Les abréviations suivantes sont mentionnées sur le schéma : BCR, B-cell receptor; Btk, Bruton's tyrosine kinase; GL, germline configuration; IRF, interféron regulatory factor; RAG, recombination-activating gene. (D'après Hendriks, R. W., & Middendorp, S. 2004)

Le pré BCR peut exercer ses fonctions de « checkpoint » en régulant certaines voies de signalisation dont NF-κB. En effet, les premières étapes de la signalisation du pré-BCR ont lieu après phosphorylation de Lyn, Blk et Syk avec ZAP70, Btk, Vav, PLC-γ2 et différentes protéines adaptatrices comme BLNK, LAB, LAT and SLP-76 (Anbazhagan et al.2013). En aval, ces molécules vont activer la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK entraînant une augmentation de la voie de la signalisation canonique NF-κB et l'activation de cFos/AP1. Le pré-BCR induit également une diminution de l'expression des gènes RAG1/2, E2A et PAX5 de façon PI3K dépendante. L'ensemble de cette étude démontre que le pré-BCR avec le CD19 vont engendrer une augmentation des signaux de divisions cellulaires. L'expression membranaire du pré-BCR survient donc au stade grand pre B comme mentionné précédemment et prend fin au stade petit pre B avec le début du réarrangement de la chaîne légère.

I.4 Cellule B immature

Le développement B se poursuit dans la moelle par le stade cellules B immatures. Un B immature est caractérisé par la signature suivante CD19+, CD20+, CD24+, CD38+, CD45+ et EBF1+, EIF4EBP1+, TNFRSF13C (Morgan, D., & Tergaonkar, V. 2022). A ce stade, les cellules B immatures vont être rendues anergiques ou bien entrer en apoptose en réponse à un antigène du soi, c'est le processus de tolérance centrale (Figure 42). L'IgM est exprimée à

la surface de ces cellules B naïves immatures mais ne sont pas encore au stade IgM+ et IgD+, stade observé chez les cellules B naïves matures.

La tolérance centrale est régulée par l'édition du BCR et l'apoptose qui opèrent de façon successive durant une période de 2 à 3 jours. Ce processus d'édition du BCR implique la recombinaison de la chaîne légère d'immunoglobuline, conduisant à des réarrangements secondaires qui peuvent altérer la spécificité du récepteur en remplaçant une chaîne légère par une autre. A ce stade, la cellule B immature voit son signal BCR qualifié de BCR tonique afin de promouvoir la sélection positive des cellules B avec des récepteurs « non liés » au travers de la signalisation PI3K dépendante tandis que la stimulation antigénique du BCR va amplifier le phénomène de sélection négative (Nemazee, D. 2017).

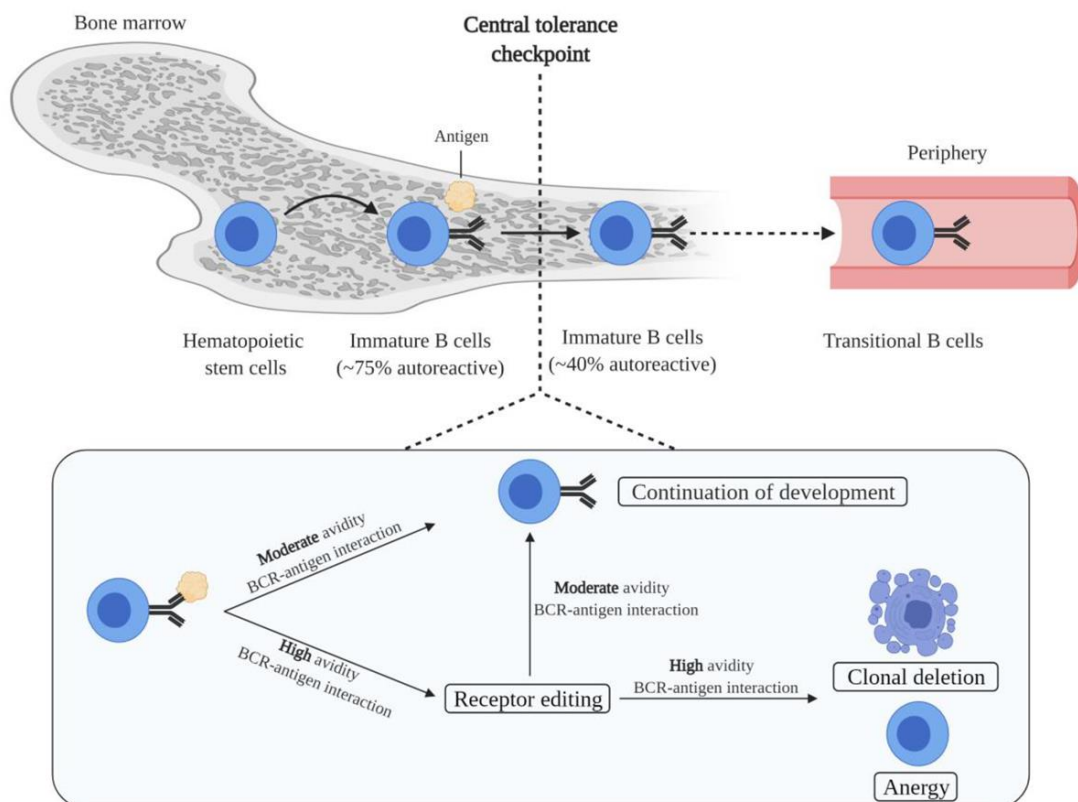


Figure 42. Elimination des cellules B auto réactives par le mécanisme de tolérance centrale

Le développement des cellules B immatures à partir des cellules souches hématopoïétiques est suivie de la génération d'un phénomène d'auto-réactivité causé par le réarrangement aléatoire du processus de recombinaison VDJ V(Variable), D (Diversity), J (Joining). Dans la moelle osseuse, une proportion significative de B immatures auto réactifs est réduite grâce à ce checkpoint de tolérance centrale. Les mécanismes appartenant au phénomène de tolérance centrale incluent l'anergie et l'édition du récepteur. La tolérance centrale et ses mécanismes intrinsèques sont médiés par la force de liaison du BCR des cellules B immatures et des antigènes du soi présents dans la moelle osseuse. Les cellules B immatures qui ont échappé aux mécanismes de tolérance centrale vont migrer en périphérie afin de poursuivre leur développement en tant que cellules B transitionnelles. (D'après Bonasia, C. G. et al. 2021)

Au stade de la cellule B immature, NF- κ B est impliquée dans la survie de ces cellules dans la moelle osseuse. Par exemple, NF- κ B va permettre la production de signaux de survie durant

les réarrangements de la chaîne légère Ig λ ou Ig κ . L'expression du BCR entraîne une différenciation en cellules B immatures qui est dépendante de NF- κ B.

II. Développement périphérique

Après une phase de développement médullaire se terminant par le stade B immature, les cellules B vont poursuivre leur maturation en périphérie. Les stades concernés par le développement périphérique sont les B transitionnels puis les B naïfs (Figure 43).

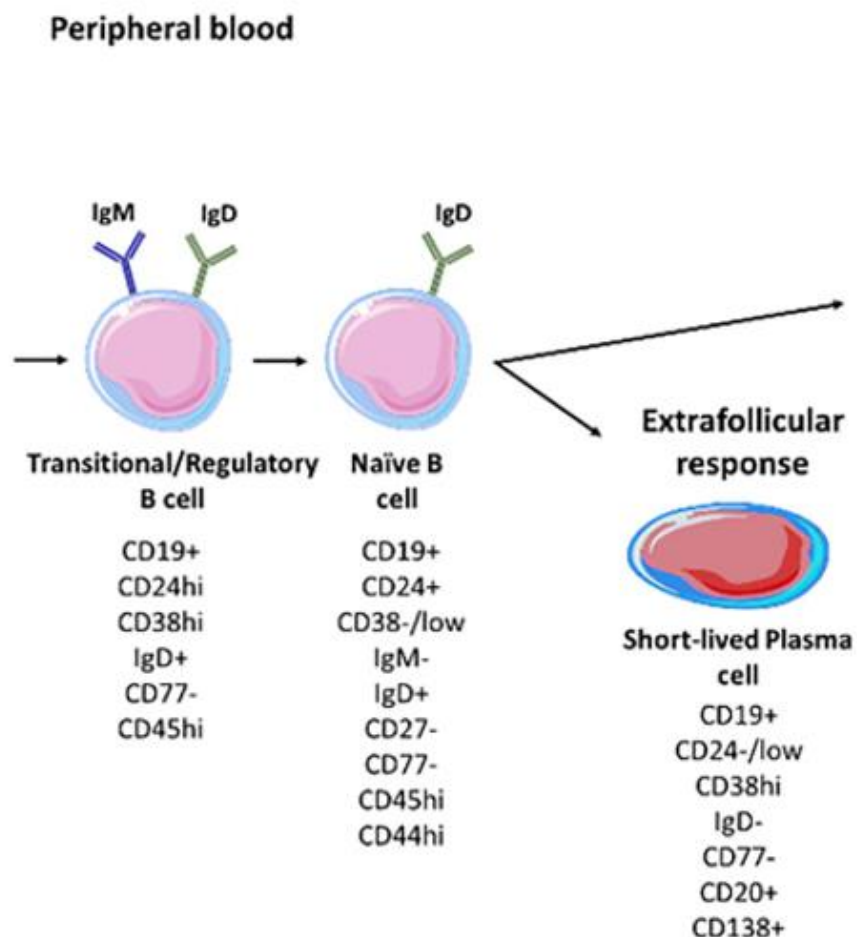


Figure 43. Développement B périphérique au niveau de la circulation sanguine (Adapté d'après Patel, A. M et al.2021)

Après un certain nombre de d'étapes de développement et de maturation au niveau de la moelle osseuse, la cellule B immature va migrer dans la circulation sanguine en tant que B dits transitionnels. Par la suite, ce B transitionnel va évoluer en B naïf qui pourra à son tour se différencier en cellules plasmiques à courte durée de vie ou bien poursuivre sa maturation au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

II.1 B transitionnels

Sur les LB transitionnels, on va retrouver les marqueurs CD19+, CD24 high, CD38 high, IgD+, CD77 et CD45 high. Une classification basée sur des caractéristiques phénotypiques et morphologiques établie par Loder et al. (Loder, B. F et al. 1999) permet de séparer deux sous-types de B transitionnels, les T1 et les T2.

Les B transitionnels T1 sont fortement IgM, IgD-, CD21-, CD23- alors que les T2 conservent également une IgM fortement exprimée mais sont IgD+, CD21+ et CD23+ (*Chung, J. B., Silverman, M., & Monroe, J. G. 2003*). En faisant usage du marqueur AA4, Allman et al. (*Allman, D et al. 2001*) ont décrit un 3e sous-type de B transitionnels T3 qui ressemble au T2 à l'exception suivante, les T3 ont des niveaux d'IgM plus faibles. L'étude montre que l'expression de l'IgM de surface (sIgM), CD23 et AA4 définissent ainsi 3 types de population non prolifératives de cellules B périphériques immatures/transitionnelles. La première est une population T1 (AA4+, CD23-, sIgM high), la deuxième T2 (AA4+, CD23+, sIgM high), et la troisième T3 (AA4+, CD23+, sIgM low).

Les T1 et les T2 vont répondre de manière différente à une stimulation antigénique. En effet les T2 sont plus aptes à répondre à un stimulus via le BCR et cela s'explique par la présence de nombreux marqueurs d'activation comme la protéine de survie BCL-xL et une prolifération amplifiée. La stimulation du BCR des B T2 conduit également à la maturation phénotypique de celles-ci alors que les T1 vont mourir. La stimulation du BCR associée au T2 dépend de la kinase BTK (Bruton Tyrosine Kinase). La BTK joue un rôle majeur dans la transition T1 vers T2. On retrouve également des sérines/thréonines kinases ERK, p38 MAPK et AKT activées dans les T2 comparé aux T1, là aussi de façon BCR dépendante. Ces voies de signalisation vont pouvoir régir les processus de développement et de sélection critiques pour la formation des cellules B matures (*Petro, J. B et al. 2002*).

Par ailleurs, une étude de Feng et al. (*Feng, B., Cheng, S., Pear, W. S., & Liou, H. C. 2004*) a mis en lumière le rôle de NF- κ B dans la régulation de points de contrôle clés au cours du développement des cellules B. Le premier concerne justement la transition pre B vers B immature et en particulier leur viabilité faisant intervenir p50 et p65 ; le second va assurer la délivrance de signaux de survie et de maturation pour le développement des B folliculaires matures grâce à p50, p52 mais également c-Rel. Les cellules B matures dépendent fortement des complexes contenant c-Rel pour réguler leur survie ainsi que leur programme de cycle cellulaire après la reconnaissance de l'antigène par le BCR.

II.2 LB naïfs

Les cellules B naïves possèdent les marqueurs CD19+, CD24+, CD38- ou low, IgM-, IgD+, CD27-, CD77-, CD45 high et CD44 high.

La différenciation en cellule B naïve peut s'opérer seulement si la capacité de transduction du signal via le BCR et le BAFF (B-cell Activating Factor) est forte (*Cariappa et al.2001*). Les cellules B naïves vont alors pouvoir migrer au travers de la circulation sanguine et du système lymphatique afin de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires : rate, ganglions lymphatiques, amygdales, plaques de Peyer et autres tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Cette migration rapproche ainsi les cellules B naïves des zones où se trouvent les cellules T. Si le B naïf ne rencontre pas d'antigène, alors il pourra de nouveau entrer dans la circulation sanguine en revanche, en absence de signaux de survie, ces cellules mourront en quelques jours. A l'inverse, si le B naïf rencontre un antigène et reçoit l'appui d'une cellule T, la cellule B ainsi activée restera dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires et initiera une réponse du centre germinatif (*Kienzler, A. K., & Eibel, H. 2016*).

Concernant le développement périphérique dans la rate, il existe des LB de la zone marginale et des LB folliculaires. La zone marginale représente une petite population de cellules B innées appelées MZB (Marginal Zone B Cells), retrouvée dans la rate mais également dans les ganglions lymphatiques ainsi que le sang. La fonction principale des LB de la zone marginale est de pouvoir répondre rapidement en cas d'infections causée par des microorganismes pathogène du sang, mais aussi de sécréter des anticorps. Cette dernière fonction est importante pour la garantie de l'élimination des débris cellulaires après apoptose. Les cellules MZB sont dotées d'un BCR faiblement réactif ou poly/auto réactif mais ils ne sont pas pathogènes. En revanche si les MZB sont activées de manière simultanée avec un antigène du soi et/ou des PAMPs/DAMPs (damage-associated molecular patterns), les MZB vont participer aux étapes initiales qui conduisent à la rupture de la tolérance immunologique (pour revue *Palm, A. K. E., & Kleinau, S. 2021*). C'est pourquoi la présence de cellules MZB dans la rate est fréquemment associée à des phénomènes d'auto-immunité et ces cellules sont capables de présenter des antigènes du soi et donc activer des lymphocytes T « helper » également auto réactifs.

Les LB folliculaires dit FOB (follicular B cell) diverge des MZB et l'engagement de la différenciation vers l'un ou l'autre est une étape clé de la différenciation périphérique de la cellule B. Les cellules B sont sélectionnées pour se différencier en ces deux sous-types selon la force de la signalisation du BCR. Ainsi, un fort signal du BCR favorise le développement des FOB I alors que des signaux moins forts induisent le développement de cellules MZB. De plus, l'association d'un BCR fort et de BAFF (B cell-activating factor) sont suffisants pour induire le type FOB II.

La voie canonique NF- κ B située en aval du récepteur BAFF est essentielle au développement des MZB. De façon intéressante, l'activation de la BTK médiée par le BCR et l'activation de c-Rel médiée par la PI3K sont requises pour le développement du sous-type FOB I. Il est également important de mentionner que la signalisation de NOTCH2 est aussi importante dans l'établissement des MZB. C'est aussi NOTCH2 qui est à l'origine de l'engagement vers le sous-type FOB versus MZB en régulant les protéines de la famille E2A (*pour revue Pillai, S., & Cariappa, A. 2009*).

Dans la littérature, les cellules B naïves ont longtemps été décrites comme incapables d'activer des cellules LT. Néanmoins, certains contacts spécifiques avec l'antigène peuvent mener ces cellules à former des contacts dont la stabilité s'étend sur plusieurs heures. Il a été montré que ces cellules B naïves conjuguées aux cellules T naïves forment une synapse immunologique au niveau de leur zone de contact. Les cellules B vont ainsi favoriser la prolifération cellulaire

des LT, et leur stimulation va également initier la différenciation en cellules T régulateurs. Cette sous population de B naïfs impliquée dans la génération de T régulateurs est appelée bTregs (Reichardt, P et al. 2007).

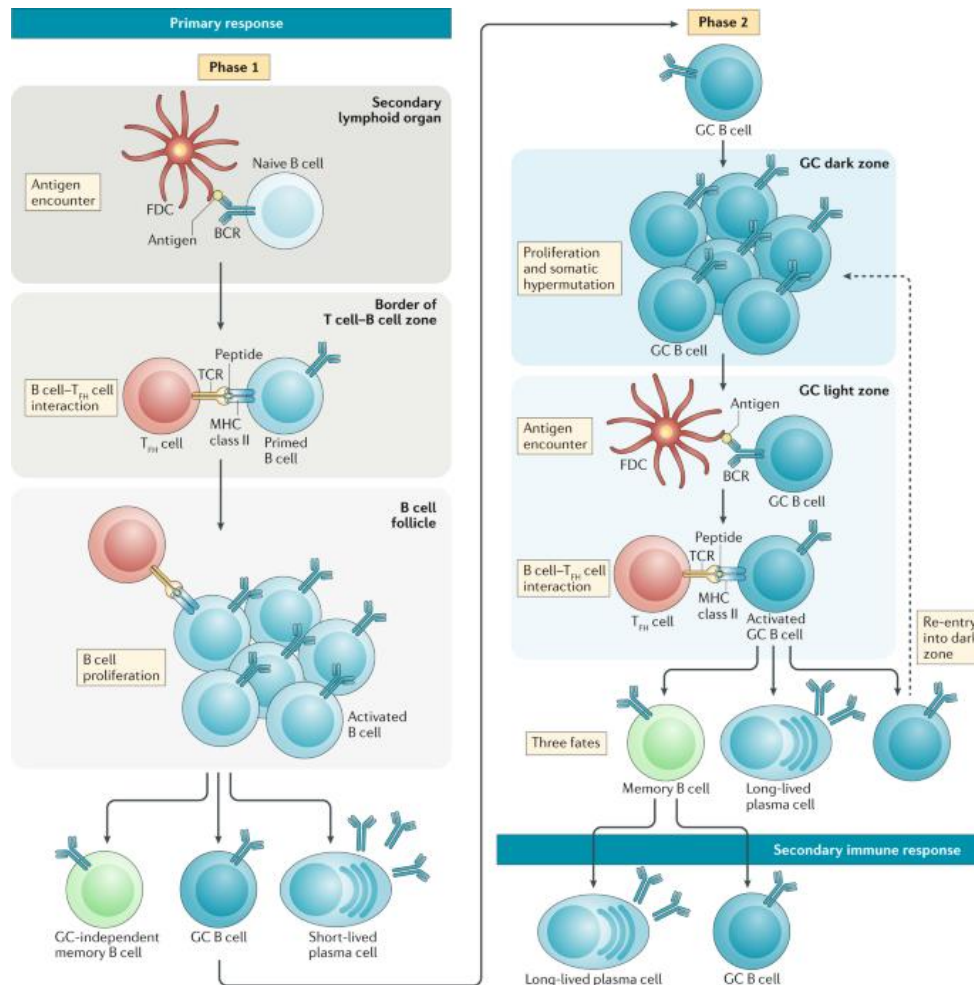


Figure 44. Acquisition de la mémoire des cellules B en 2 phases

Lors de la phase 1 (gauche), les cellules B naïves quittent la circulation sanguine pour entrer dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires et surveillent l'environnement à la recherche d'antigènes. Les antigènes repérés et capturés par les cellules folliculaires dendritiques activent les cellules B via le BCR. Les antigènes subissent différents processus et sont ensuite présentés aux cellules T à la limite de rencontre LB LT, entraînant alors les cellules B naïves à proliférer et se différencier en 3 types cellulaires : cellules B du centre germinatif (germinal center GC), des cellules B mémoires indépendantes du GC et des cellules plasmatisques à courte durée de vie. Lors de la phase 2 de la réponse primaire (droite), les cellules B du GC (GCB) nouvellement différenciées vont former les centres germinatifs et subissent l'hypermutation somatique (SHM) dans la zone sombre avant de migrer vers la zone claire où elles rencontreront les antigènes présentés par les cellules folliculaires dendritiques. Les GCB vont ensuite présenter l'antigène au LT folliculaire dits helper TF_H et peuvent ensuite se différencier en cellule B mémoire, en cellule plasmatisque à longue durée de vie ou entrer de nouveau dans la zone sombre du GC. Dans la réponse secondaire (en bas à droite) les cellules B mémoires répondent à l'antigène, se différencient en cellules plasmatisques à longue durée de vie ou en B du GC qui vont subir les réactions propres aux GC (mentionnées dans le chapitre 1) (D'après Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. 2020)

La littérature montre qu'au stade de B naïfs, la voie NF- κ B est garante de la survie de ces cellules et du bon déroulé du développement B à ces stades précoces (*Gerondakis, S., & Siebenlist, U. 2010 ; Kaileh, M., & Sen, R. 2012 ; Klein, U., & Heise, N. 2015*).

II.3 Cellules plasmatisques à courte durée de vie

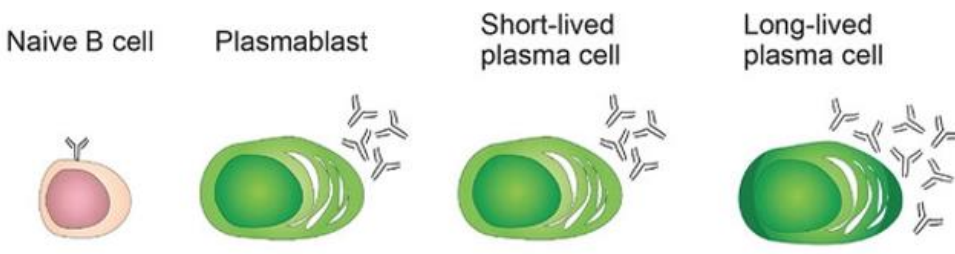
Dans les organes lymphoïdes secondaires, il y a des follicules primaires I quiescents qui sont constitués de cellules B naïves capables de migrer et rechercher leur antigène, mais également des follicules secondaires II activés contenant un centre germinatif constitué d'un pool de cellules blastiques (*Allen, C. D., & Cyster, J. G. 2008*).

Après la rencontre avec l'antigène, la cellule B peut se différencier en cellules B du centre germinatif ou bien prendre la trajectoire d'une cellule B plasmatisque à courte durée de vie (Figure 44). Une cellule plasmatisque à courte durée de vie possède les marqueurs suivants : CD19+, CD24-/low, CD38 high, IgD-, CD77-, CD20+, CD138+. Les cellules plasmatisques à courte durée de vie vont être rapidement formées au sein des organes lymphoïdes secondaires où elles vont subir des processus d'apoptose une fois la phase intensive de sécrétion d'anticorps réalisée (*Smith, K. G., Hewitson, T. D., Nossal, G. J. V., & Tarlinton, D. M. 1996*). Les cellules plasmatisques à courte durée de vie vont donc être opposées à une autre population de cellules plasmatisques qui va survivre sur une période plus longue afin de maintenir une immunité humorale sur le long terme (*Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., & Ahmed, R. 1998*).

Il existe un stade intermédiaire entre les cellules B naïves et les plasmocytes à courte durée de vie appelé plasmablastes (Figure 41) (*pour revue Tellier, J., & Nutt, S. L. 2019*).

Les plasmablastes sont des cellules à courte durée de vie, capables de circuler et produites en grand nombre lors de la réponse immune précoce. Dans la réponse primaire, les plasmablastes n'ont pas encore subi le processus d'hypermutation somatique dans les centres germinatifs et produisent des anticorps de faibles affinités. Les plasmablastes peuvent être activés par des protéines de façon T dépendante ou non, notamment via des polysaccharides. Cette réponse primaire est notamment favorisée dans la zone marginale. Par ailleurs, les plasmablastes sont retrouvés en supériorité numérique lors des phases de réponses secondaires à l'infection, la vaccination ou lors d'une pathologie auto-immune. En revanche, ces plasmablastes qui dérivent de cellules B mémoires qui ont déjà subi la maturation d'affinité dans les réactions propres du centre germinatif sont capables de produire des anticorps d'affinité conséquente pour leurs cibles (*Nutt, Stephen L., et al. 2015*).

De façon générale, les plasmablastes sont des cellules se divisant de manière inégale (*Tooze, Reuben M. 2013*), et seulement une petite partie va avoir la capacité de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie (*Amanna, Ian J., Nichole E. Carlson, and Mark K. Slifka. 2007; Chang, Hyun-Dong, Koji Tokoyoda, and Andreas Radbruch. 2018; Landsverk, Ole JB, et al. 2017*).



	Naive B cell	Plasmablast	Short-lived plasma cell	Long-lived plasma cell
Blimp-1	-	++	++	+++
Lifespan	++	+	+	+++
Proliferation	-	++	-	-
Location	BM, SLO, blood	SLO, Blood	SLO	BM, LP
Isotype	IgM/D	All isotypes	IgM>IgG	IgG>IgA>IgM
Ab secretion rate	-	++	++	++++
Glucose uptake	-	++	++	+++
Autophagy	+	++	++	+++
mTORC1 activity	-	+	+	+++
UPR	-	+++	+++	+++

Figure 45 Schéma récapitulatif des propriétés métaboliques et cellulaires des cellules sécrétrices d'anticorps

Sur le schéma est représenté le processus de maturation des cellules sécrétrices d'anticorps ou ASC pour Antibody Secreting Cells). Les caractéristiques phénotypiques propres des cellules B naïves et des stades ultérieurs de différenciation (Plasmablaste, cellule plasmatique à courte durée de vie et longue durée de vie) sont indiquées. Un « - » fait état d'un manque du composé mentionné ou d'un défaut de processus, et un « + » ou « ++ » suggèrent des niveaux d'expressions ou d'activités élevés. Les abréviations mentionnées correspondent à : Ab, antibody; BM, bone marrow; LP, lamina propria; SLO, secondary lymphoid organ; UPR, unfolded protein response. (D'après Tellier, J., & Nutt, S. L. 2019)

III. Développement périphérique dans le thymus

En contexte physiologique, le thymus contient également une petite proportion de lymphocytes B dont les origines ainsi que les fonctions ne sont pas toutes connues. Il est pourtant mentionné dans la littérature que ce sous-type de cellules B développé à partir de progéniteurs dans le thymus fonctionnent indépendamment du pool de LB situé en périphérie. On les appelle les cellules B thymiques, elles sont phénotypiquement distinctes des cellules B folliculaires et des cellules B1. Elles possèdent une forte expression du CMHII, de diverses

molécules de costimulation et sont capables d'initier des interactions cellulaires lors des processus de présentation de l'antigène. Les cellules B thymiques vont être retrouvées à la jonction cortico-médullaire suggérant ainsi qu'elles pourraient être impliquées dans la sélection négative des LT. La littérature démontre qu'en effet, les LB auto réactifs contribuent à la sélection négative des LT tandis que les LB thymiques pourraient être impliqués dans la suppression spécifique d'un sous type-particulier de LT auto réactifs (*Fehervari, Z. 2013*). Au niveau du thymus, on parlera donc d'un phénomène de tolérance périphérique. C'est-à-dire que cette tolérance périphérique s'assure que les cellules B et T sortant du thymus ne peuvent pas entraîner des phénomènes d'auto-réactivité.

Par ailleurs, une étude a montré que ce même pool de LB dits thymiques, est capable de promouvoir la formation de structures similaires aux centres germinatifs et peuvent aider à l'expansion cellulaire des T folliculaires (*Hidalgo, Y et al.2020*).

Par ailleurs, il existe une population de cellules B dites B1 dont la maturation s'effectue au niveau du foie contrairement au sous-type B2 retrouvé dans la moelle osseuse. Les cellules B1 constituent un pool de cellules sélectionné pour leur capacité d'auto réactivité et constituent un groupe cellulaire à longue durée de vie, capable de s'autorenouveler et de produire des IgM (*Baumgarth, N. 2011*). Les cellules B2 quant à elles représentent la majorité des cellules B, elles sont de courte durée de vie, recirculent et sont métaboliquement quiescentes. Elles peuvent être activées dans les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent collaborer avec les LT « helper » pour générer des anticorps spécifiques, c'est le sujet du paragraphe suivant (*Mahajan, V. S et al. 2021*).

IV. Développement périphérique dans le centre germinatif

Les B naïfs vont être impliqués dans une première phase de réponse à la suite de la rencontre avec un antigène. On parle de réponse primair.

Une grande partie du développement B va se passer dans une structure lymphoïde secondaire appelée centre germinatif ou GC (germinal center) (Figure 46). Les GC sont définis comme de micro-structures anatomiques où a lieu l'expansion clonale et le développement de l'affinité des anticorps ainsi que leur maturation. C'est au niveau de ces mêmes GC que les LB subissent le processus de sélection Darwinien d'hypermutation somatique et de sélection par critères d'affinité des immunoglobulines dans le but de produire des anticorps de très haute affinité, essentiels pour la médiation de l'immunité humorale (*Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. 2022*).

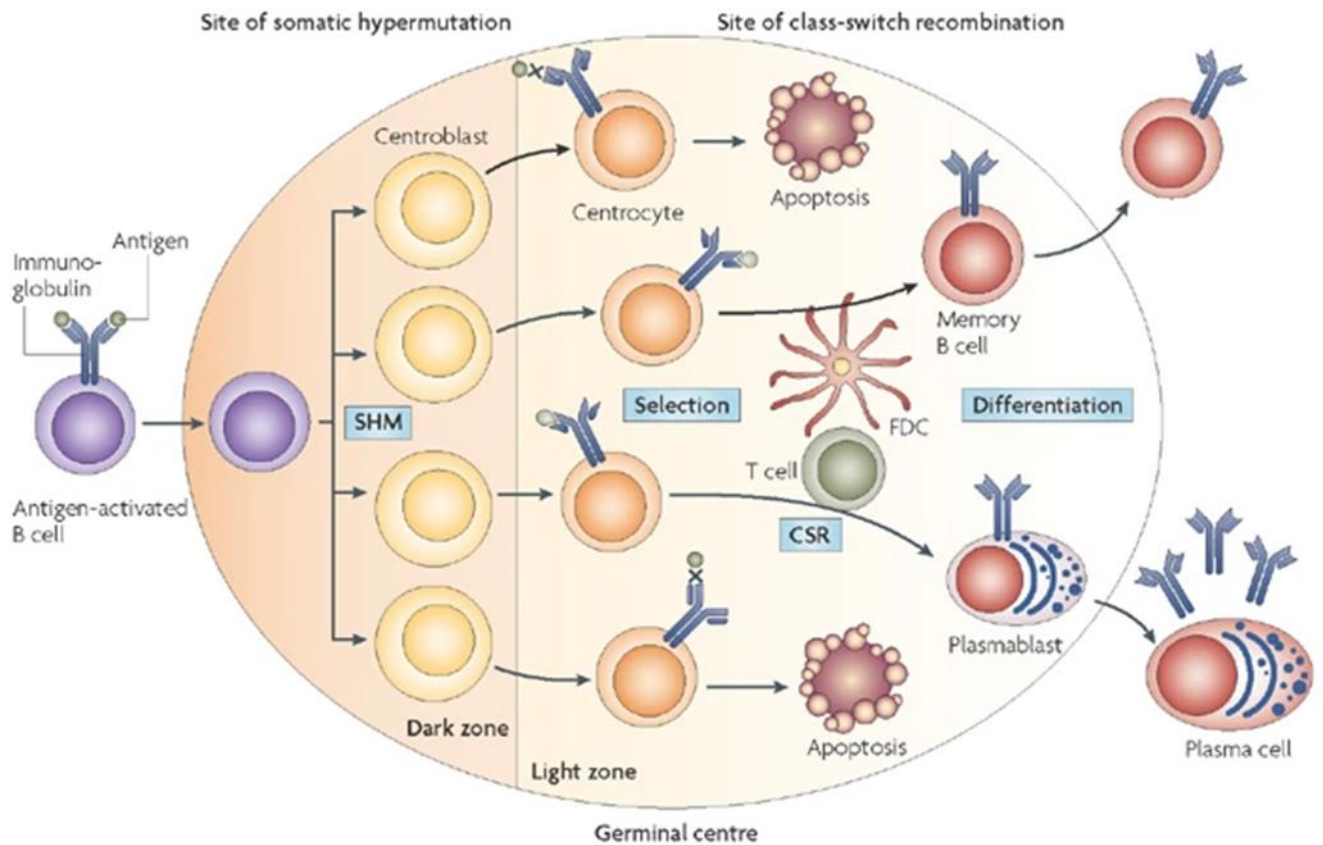


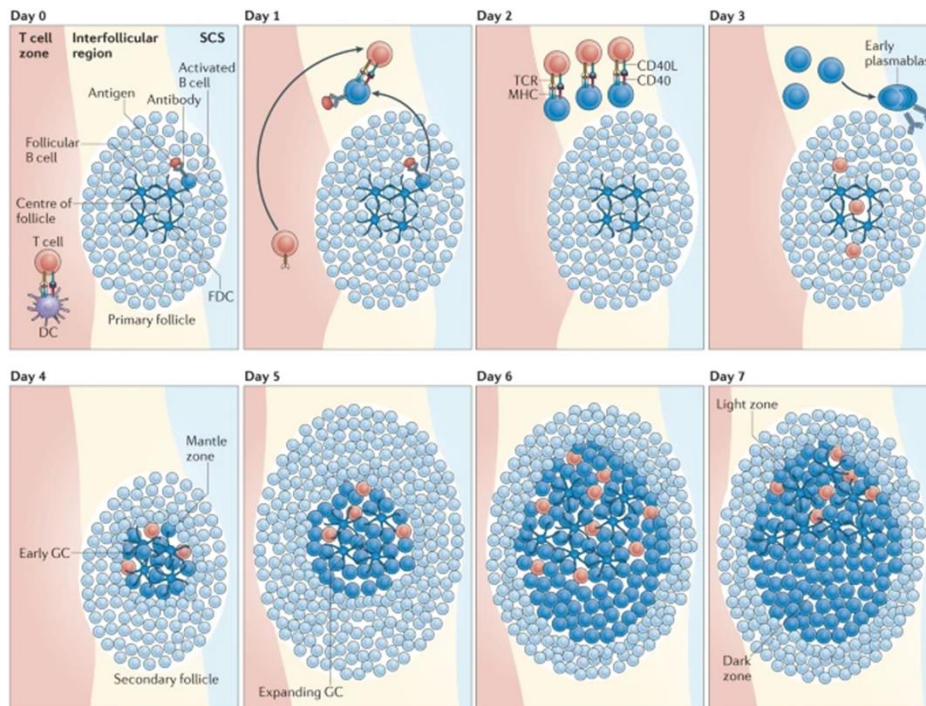
Figure 46. Structure et microenvironnement des Centres Germinatifs

Les LB activés via un antigène vont se différencier en centroblastes qui vont subir l'expansion clonale dans la zone sombre du GC. Durant la prolifération, le processus d'hypermutation somatique va induire des changements de bases au niveau de la jonction V(D)J des gènes réarrangés codant pour les régions variables des segments IgV de la chaîne lourde et légère. Certaines de ces mutations conduisent à un changement de la séquence en acides aminés. Les centroblastes vont ensuite se différencier en centrocytes et progresser vers la zone claire où ils vont modifier leur récepteur à l'antigène avec l'aide des cellules immunes T et cellules dendritiques folliculaires. Le but ici est d'améliorer la capacité de liaison à l'antigène. Les centrocytes néo synthétisés capables de produire des anticorps non favorables subissent l'apoptose et sont éliminés. Une petite partie des centrocytes va s'engager dans le processus de recombinaison de classe. Il existe une circulation dynamique des centroblastes et des centrocytes entre la zone sombre et claire du GC médiée par un gradient de chimiokines établi par les cellules stromales des 2 zones respectives (Allen, C. D et al. 2004). Les centrocytes sélectionnés de façon favorable vont pouvoir se différencier en cellules B mémoires ou bien en cellules plasmatisques. (D'après Klein, U., & Dalla-Favera, R. 2008).

La première description des GC remonte à 1884 par Flemming, et cette structure particulière est qualifiée de clusters de réplication pour les cellules dans les amygdales chez l'Homme. Les GC sont également identifiés comme source primordiale du pool de lymphocytes (Nieuwenhuis, P., & Opstelten, D. (1984). Les GC sont donc des structures transitoires qui se forment au sein des organes lymphoïdes périphériques en réponse à des antigènes dépendants des cellules T (MacLennan, I. C. 1994). Au sein des GC, les cellules B vont pouvoir exprimer des anticorps de haute affinité et se différencier en cellules sécrétrices

d'anticorps les plasmocytes et cellules mémoires médiant et garantissant une protection efficace contre les invasions de pathogènes. Les réactions du GC sont d'une importance primordiale car en cas de défaut les syndromes d'immunodéficience sont observés dans la plupart des patients ne pouvant plus assurer la formation de ces GC, pour revue (*De Silva, N. S., & Klein, U 2015*).

La formation du GC se fait donc en plusieurs étapes après la rencontre de l'antigène et selon les étapes successives mentionnées sur la Figure 46.



Nature Reviews | Immunology

Figure 47. Initiation des réactions du GC et formation d'un GC mature dans le ganglion lymphatique

Le schéma représente les étapes successives conduisant aux réactions du GC et la formation d'un GC mature au sein du ganglion lymphatique. Cette figure est établie à partir d'études récentes ayant montré les mouvements des antigènes spécifiques aux cellules B et T dans les ganglions lymphatiques durant la réponse immune (Kerfoot, S. M et al. 2011 ; Kitano, M et al. 2011). A J0, les LB et LT sont activés par la reconnaissance de leur antigène dans le follicule primaire et la zone T respectivement. A J1, les cellules B et T activées vont migrer dans la région inter folliculaire et pouvoir initier des interactions entre elles. C'est à J2 que les cellules B et T vont pouvoir former des interactions sur le long terme permettant le potentiel d'activation le plus haut pour les cellules B. Les cellules T vont acquérir les caractéristiques phénotypiques des cellules T folliculaire helper (Tfh). A J3, les Tfh vont migrer de la région interfolliculaire vers l'intérieur du follicule. Certains B activés par l'antigène se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmablastes précoces. Ceux-ci vont migrer dans une région adjacente appelée sinus sous capsulaire (SCS subcapsular sinus). Au J4, les cellules B migrent à leur tour de la région inter folliculaire vers la partie centrale du follicule qui est caractérisé par un réseau dense de cellules folliculaire dendritiques (follicular dendritic cells FDCs). Les B vont alors débuter leur prolifération et entraîner la poussée des cellules folliculaires résidentes de côté pour former le centre germinatif précoce consistant en un pool de cellules B blastiques entouré la zone du manteau. Cette structure est aussi appelée follicule secondaire, le distinguant du follicule primaire qui est moins abouti en phénotype GC. Aux jours 5 et 6, le GC continue son expansion de façon rapide dû à la prolifération intense des cellules B blastiques. Au 7^e jour, les zones sombres et claires se forment modelant ainsi l'architecture du GC mature. La zone sombre consiste en une zone dense regroupant un nombre consistant de cellules B blastiques alors que la zone claire contient les Tfh et les cellules FDCs. Les abréviations mentionnées sur le schéma sont : CD40L, CD40 ligand; DC, dendritic cell; TCR, T cell receptor. (D'après De Silva, N. S., & Klein, U 2015)

Le GC est donc une structure riche en cellules ayant leurs caractéristiques propres. La première approche pour identifier les populations de LB du GC (ou GCB) se fait par le biais de la cytométrie en flux puis, avec le perfectionnement des techniques scientifiques, les GCB ont pu être étudiées par approche single-cell mentionnée dans la revue de Attaf et al (*Attaf, N., Baaklini, S., Binet, L., & Milpied, P. 2021*). Les GCB sont caractérisées par un phénotype de surface spécifique et sont reconnues via les marqueurs CD19⁺ B220⁺ IgD⁻ CD38⁻ GL7⁺ CD95⁺ PNA⁺ chez la souris et CD19⁺ IgD⁻ CD38^{int} CD10⁺ chez l'Homme. Les GCB sont également connues pour exprimer fortement BCL6, mis en avant par un marquage intracellulaire. Ensuite, on peut distinguer les GCB de la zone claire (LZ Light zone) CD83⁺ CD86⁺ CXCR4^{lo}, des GCB de la zone sombre (DZ Dark Zone) CXCR4^{hi} CD83⁻ CD86⁻ (*Victoria, G. D., et al. 2010*). Cette stratégie est utilisée pour identifier les populations LZ et DZ également chez l'Homme (*Victoria, G. D et al. 2012*). La cytométrie est donc utilisée pour étudier l'expression de marqueurs additionnels ou bien trier les populations GCB en vue de caractérisations plus poussées par utilisation du séquençage ou bien de culture cellulaire.

Les différentes méthodes de d'études des populations GCB sont représentées sur la figure

48.

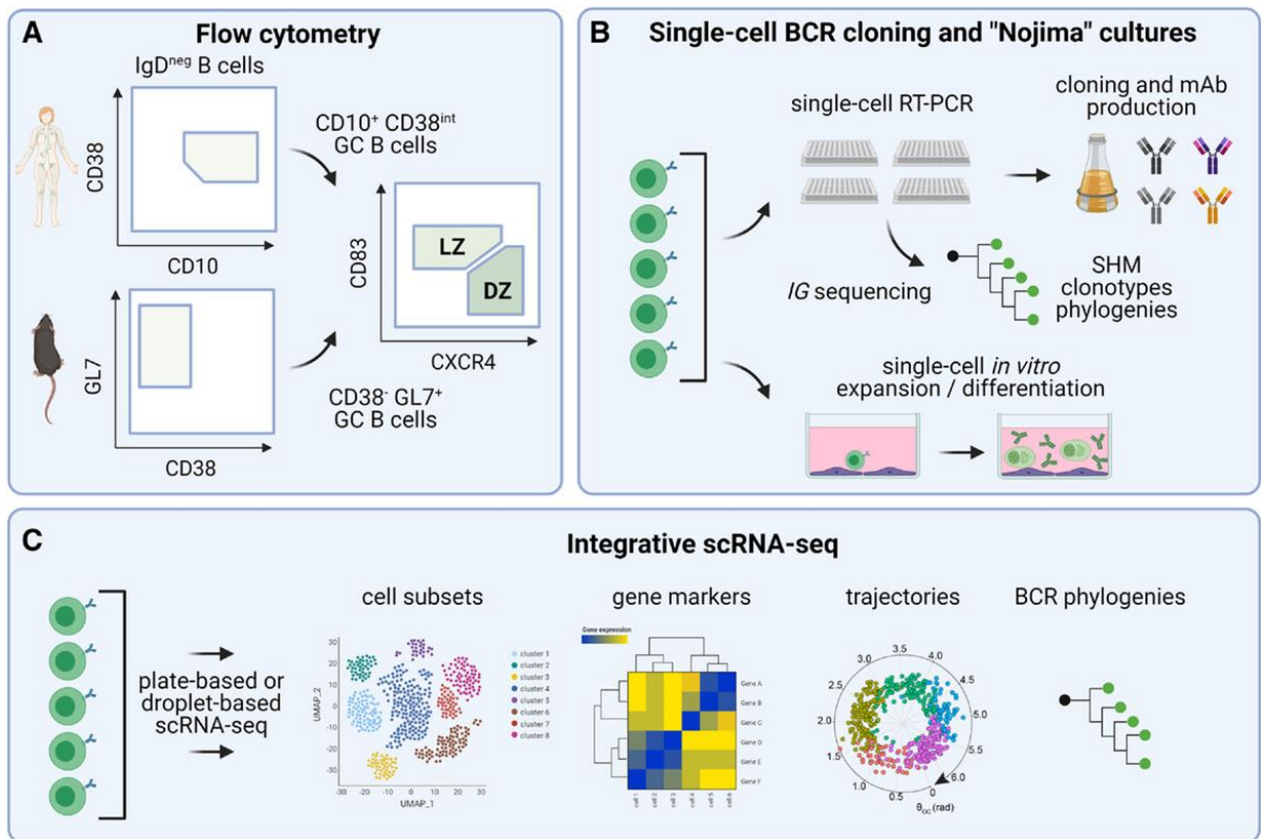


Figure 48. Approche single cell pour l'étude des populations GCB

Les méthodes de single-cell pour l'étude des populations GCB sont représentées sur cette figure. (A) Représentation schématique de la stratégie de gating pour l'identification des populations GCB humaines en haut et murines en bas puis le gating permettant la distinction entre les populations LZ et DZ. (B) Représentation schématique des méthodes de séquençages et de production de BCR à partir d'une seule cellule B : amplification par single-cell RT-PCR des gènes Ig puis séquençage des amplicons et clonage (haut) ou culture single-cell *in vitro* sur feeder pour promouvoir la prolifération des cellules CB et leur différenciation en cellules productrices d'anticorps plasmablastes (bas). (C) Représentation schématique des méthodes nécessitant le single-cell RNA-seq pour l'analyse du transcriptome et des séquences du BCR en parallèle (d'après Attaf, N., Baaklini, S., Binet, L., & Milpied, P. 2021)

Le GC, du fait de sa constitution sa nature et ses fonctions, représente donc une structure très dynamique et essentielle à la bonne maturation des cellules B (Figure 49).

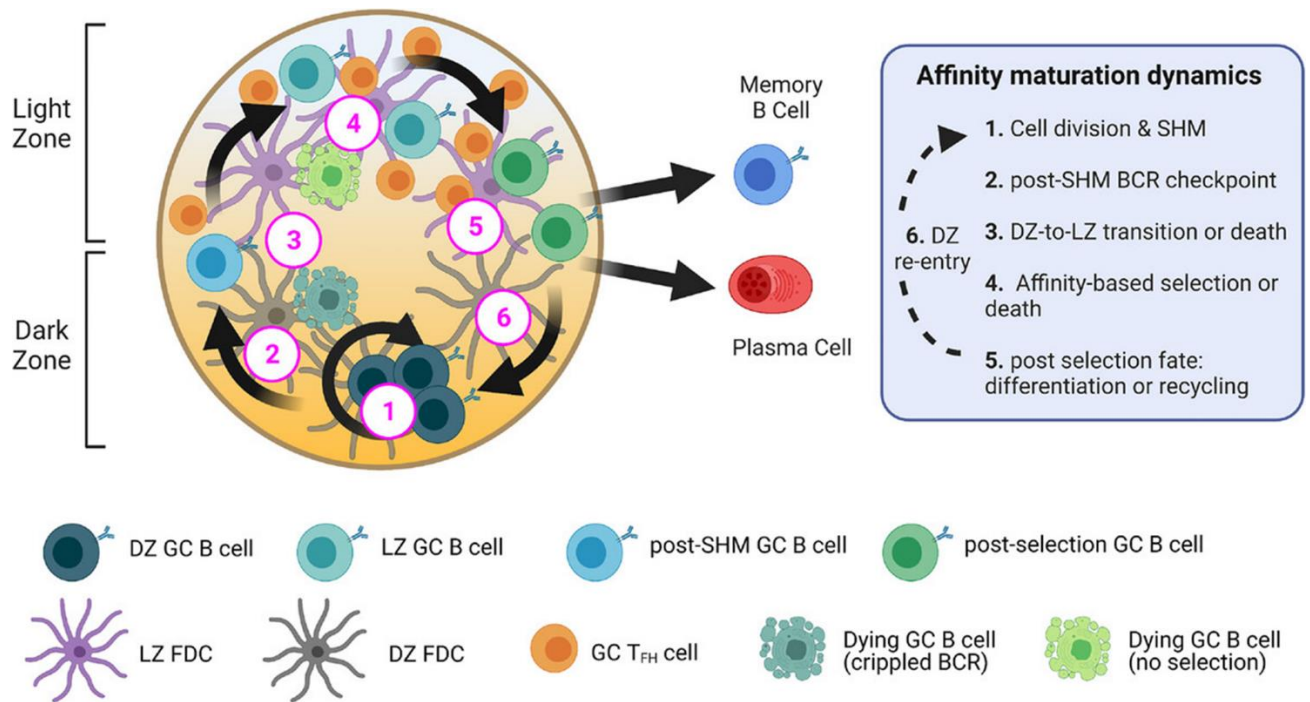


Figure 49. Représentation schématique de la structure dynamique du GC

Durant les processus de maturation d'affinité dans les GC, les GCB subissent une série de changements fonctionnels et de checkpoint de sélection (numérotés de 1 à 6) qui ont lieu de façon séquentielle dans des microenvironnements distincts. La LZ (en haut) contient des FDC et les GC TF_H. La DZ (en bas) contient les FDC de la DZ. Les GCB de la DZ se divisent et subissent la SHM dans la DZ (n°1). Les GCB post-SHM peuvent exprimer un BCR non fonctionnel dans ce cas elles vont mourir par apoptose dans la DZ (n°2). Si les GCB expriment un BCR fonctionnel alors ces GCB post-SHM migrent vers la LZ (n°3). Les GCB de la LZ subissent ensuite une sélection selon leur affinité dans la LZ (n°4). Les cellules non sélectionnées vont mourir par apoptose dans la LZ. Les GCB post sélectionnés peuvent avoir 1 des 3 devenir possibles (n°5) : se différencier en B mémoires, en cellules plasmiques, ou bien être recyclées pour entrer de nouveau dans la DZ (n°6) et ré-initier un cycle de maturation. (D'après Attaf, N., Baaklini, S., Binet, L., & Milpied, P. 2021)

Pour résumer (pour revue Klein, U., & Dalla-Favera, R. 2008), le GC constitue donc l'organe lymphoïde où les cellules B ayant été activées par un antigène peuvent diversifier leur gène d'immunoglobuline par le processus de SHM afin de promouvoir la génération d'anticorps de haute affinité. La plupart des cellules subissent ensuite la CSR pour garantir la génération d'anticorps avec des fonctions effectrices spécifiques.

Comme vu dans le chapitre 1, que ce soit la SHM ou la CSR, les 2 processus sont associés à des cassures de l'ADN. C'est pourquoi les cellules GCB vont utiliser des mécanismes spécialisés leur permettant une activité de modification de l'ADN sans induire de réponse de réparation de celui-ci, notamment en inhibant l'apoptose p53 dépendante et indépendante.

Nous verrons dans la suite de cette partie que ce sont les centroblastes qui subissent la SHM et sont programmés pour proliférer de façon importante afin de constituer un nombre élevé de mutations d'immunoglobulines dans un temps restreint qui vont ensuite permettre la sélection des anticorps de haute affinité. Cependant, ces centroblastes sont également dotés d'un

programme pro-apoptotique qui est garant de l'élimination rapide de la cellule qui serait amenée à générer des anticorps avec des propriétés de liaison sous-optimisées.

Le facteur de transcription BCL6 est l'acteur majeur de régulation de la différenciation des GCB car il est responsable de la répression des gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire et de l'inhibition des gènes en lien avec l'activation des cellules B. BCL6 assure également le blocage de la différenciation en plasmocytes et en B mémoires ainsi que la réponse au stress génotoxique.

Les GCB sont donc capables de produire des anticorps de haute affinité et sont sélectionnées sur leur capacité à se différencier en plasmocytes et en cellules mémoires au travers de changements de programmes d'expression génique qui vont coordonner la régulation de la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Il existe alors plusieurs facteurs de transcriptions qui vont assurer la régulation de l'ensemble de ces processus comme BCL6 déjà mentionné mais aussi PAX5, NF- κ B, IRF4, BLIMP1 et XBP1.

Cependant, les gènes impliqués dans l'ensemble de ces processus complexes, prolifération, apoptose et différenciation lors de la réponse du GC sont sujets aux dérégulations par l'intermédiaire d'altérations génomique. Parmi elles, les translocations chromosomiques où le phénomène de SHM dans des régions régulatrices, a pour conséquences l'induction d'erreurs durant les modifications géniques de l'anticorps. La production d'anticorps de haute affinité est donc source de transformation oncogénique. Cet aspect sera développé dans la chapitre suivant.

Nous allons voir dans cette dernière partie du chapitre 2, les stades de développement et de maturation B se déroulant dans le centre germinatif, du centroblaste au centrocyte (Figure 44). A noter que la voie NF- κ B est fortement impliquée dans les stades de maturation B dans le GC, en particulier la voie canonique avec les sous-unités RelA et c-Rel.

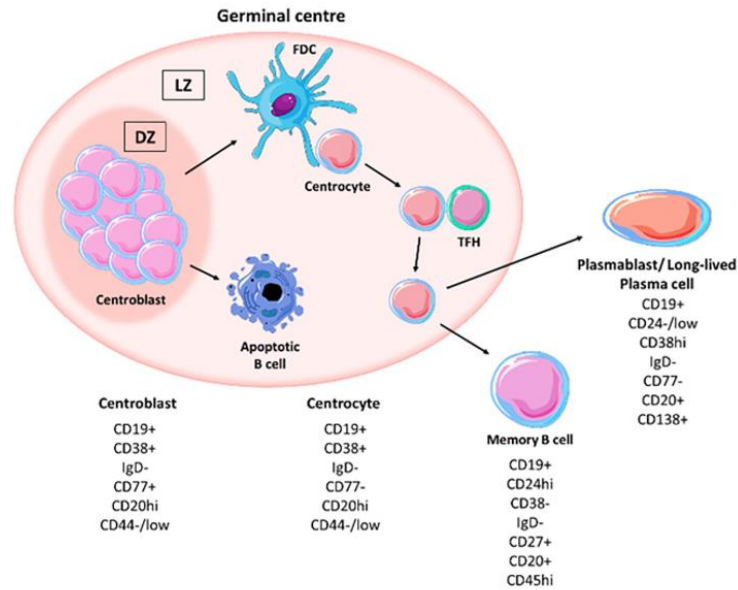


Figure 50. Etapes de développement B au niveau du Centre Germinatif

Après la rencontre avec l'antigène, les cellules B activées vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et vont entrer dans le centre germinatif afin de subir l'expansion clonale et l'hypermutation somatique (SHM) dans la zone sombre (DZ). Les LB avec des mutations défavorables sont éliminées par apoptose, ceux qui demeurent favorables pour une bonne affinité vont interagir avec les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les LT helper folliculaire (TFH) dans la zone claire (LZ). Les LB subissent la recombinaison de classe (CSR) et reçoivent les signaux de survie pour se différencier en B mémoires ou cellules plasmatisques à longue durée de vie (Perez-Andres, M et al. 2010). Les cellules B naïves peuvent se différencier en cellules plasmatisques à courte durée de vie via les réponses extra folliculaires (Elsner, R. A., & Shlomchik, M. J. 2020). Les B naïfs peuvent également se différencier en cellules B associées à l'âge sous condition de stimulation (Ma, K et al. 2019). (D'après Patel, A. M et al. 2021).

Il est important de mentionner ici que la voie NF- κ B par le biais de ses sous-unités activatrices est capable de moduler l'environnement du GC (Figure 51) pour revue (Kennedy, R., & Klein, U. 2018).

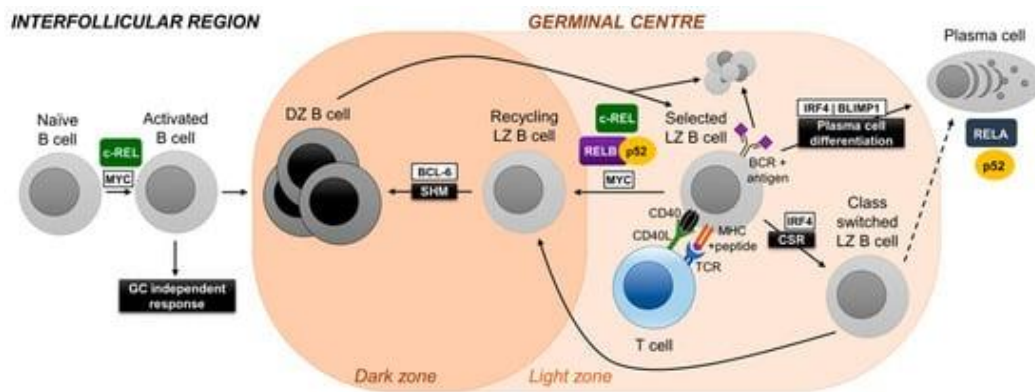


Figure 51. Rôle des sous-unités NFκB dans l'initiation des centres germinatifs, la maintenance et la différenciation

Les cellules plasmiques de haute affinité et les cellules B mémoires sont générées au moment des réactions du centre germinatif. Au jour 7 de la réponse des centres germinatifs, un micro-environnement polarisé du GC est établi comprenant une zone sombre (DZ) où les GCB subissent l'hypermutation somatique de leur régions IgV et migrent vers la zone claire (LZ) où elles vont améliorer leur affinité à l'antigène et subir la pression de sélection positive. Ce processus implique les cellules dendritiques folliculaires ainsi que les cellules T folliculaires helper. Les GCB sélectionnées peuvent repartir vers la zone sombre pour proliférer et hypermuter leur IgV ou bien se différencier en cellules plasmiques et B mémoires. c-Rel est requis pour l'activation des cellules B alors que RelA n'est pas indispensable à cette étape. De manière indépendante, c-Rel et RelB/p52 permettent la recirculation de ces GCB sélectionnés de la zone claire vers la zone sombre et pour la maintenance des réactions du GC. A l'inverse, RelA est nécessaire pour la différenciation du GCB en précurseur de cellule plasmique : le plasmablaste. La sous-unité p52 seule (sans RelB) est essentielle pour la physiologie des cellules plasmiques. (D'après Kennedy, R., & Klein, U. 2018)

IV.1 Centroblastes

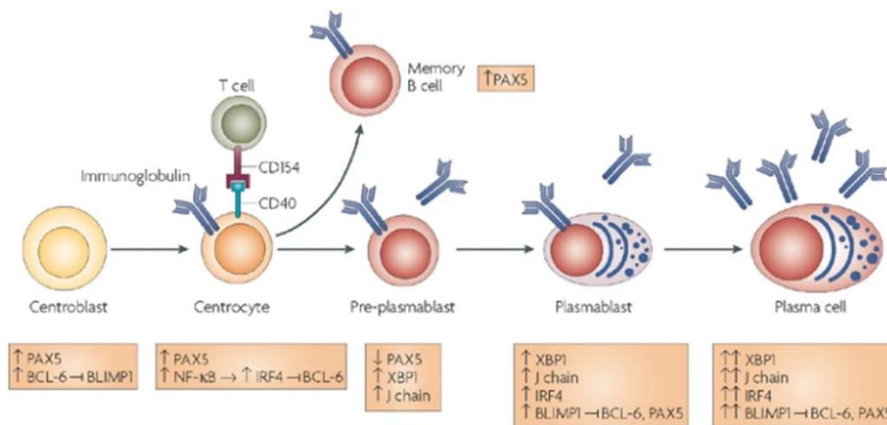
Les cellules B naïves entrent dans le centre germinatif en tant que centroblastes avec les marqueurs suivants : CD19+, CD38+, IgD-, CD77+, CD20high, CD44-/low. C'est au stade centroblaste que la cellule B subit les processus d'expansion clonale, d'où le nom de zone sombre du GC due à la densité cellulaire, et le phénomène d'hypermutation somatique (cf Chapitre 1).

Les centroblastes sont programmés pour proliférer rapidement afin de générer un grand nombre de mutations dans les immunoglobulines en un temps court. C'est à partir de ce pool que peut ensuite avoir lieu la sélection des anticorps de haute affinité. C'est au niveau des centroblastes que s'effectue une augmentation du facteur PAX5 (paired box protein 5) et une augmentation de BCL6 entraînant une inhibition du facteur BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1). A noter lors des processus de transformation maligne, les fonctions physiologiques de BCL6 peuvent être altérées (pour revue Basso, K., & Dalla-Favera, R. 2012). Dans les GCB, BCL6 assure des fonctions de répresseur transcriptionnel en supprimant les gènes impliqués dans les voies de détections des dommages à l'ADN incluant P53, ATR ou CHEK1 ainsi que les régulateurs du cycle cellulaire p21, p53 (Basso, K et al.2010 ; Huang, C., Geng, H., Boss, I., Wang, L., & Melnick, A. 2014). Cela permet donc la prolifération rapide des cellules et la capacité de tolérance aux cassures ADN requises pour

la SHM. En plus de cela, BCL6 va également contrôler la migration des cellules B dans le follicule c'est pourquoi les cellules GCB BCL6 déficientes présentent des défauts de régulation de CXCR4 normalement responsable de la localisation des GCB de la zone sombre. Les cellules GCB BCL6 déficientes ne sont alors plus capables d'activer CXCR4 (*Kitano, M et al.2011*) et ne peuvent plus réguler l'expression de la S1PR1 (sphingosine-1 phosphate receptor type 1) (*Huang, C et al.2014*) qui permet également le bon trafic des cellules B hors des follicules (*Cinamon, G et al.2004*).

Concernant PAX5, il est essentiel pour l'engagement des cellules progénitrices vers une différenciation B et possède un double rôle de répression des gènes inappropriés à la lignée B et d'activation des gènes spécifiques de cette lignée (*Cobaleda, C et al. 2007*). PAX5 est le régulateur de l'identité de la cellule B du stade pro B (*Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A., & Busslinger, M. 1997*) au stade GCB mature (*Horcher, M., Souabni, A., & Busslinger, M. 2001*). Dans les centroblastes, PAX5 régule l'expression de certains composés du BCR (la chaîne lourde IgH et le CD79A), CD19, CD21, BLK (B lymphocyte Kinase), les interférons IRF4 et 8 (*Revilla-i-Domingo, R et al. 2012*). Etant donné que PAX5 est un acteur majeur de l'établissement de l'identité B, il est donc capable de réprimer l'expression des gènes responsables de l'établissement des autres lignées cellulaires comme FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), CCR2 et CD28 exprimés dans les plasmocytes après régulation négative de PAX5 et le récepteur au M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), NOTCH1, RAMP1, LMO2 et CCL3 exprimés chez les CLP et ainsi que les cellules myéloïdes (*Delogu, A et al.2006*).

La voie NF- κ B va être « up » régulée dès le stade suivant de différenciation en centrocytes (Figure 51).



Nature Reviews | Immunology

Figure 52. Programme transcriptionnel du Centre Germinatif et stades de différenciation terminales post GC

Le centre germinatif possède un programme de transcription différentiel entre un centroblaste et un centrocyte. Cependant l'expression de ce programme ne peut se faire qu'au travers d'une stimulation CD40 médiée par les cellules LT du GC qui conduit à la répression de BCL6 (B-cell Lymphoma 6) par l'IRF4 (Interferon regulatory Factor 4). L'étape du centrocyte représente alors une source commune de cellule pour un engagement vers la différenciation en cellules mémoires et en cellules plasmatiques. L'inactivation du facteur PAX5 (Paired Box Protein 5) par des stimuli et mécanismes non décrits semble constituer la première étape d'engagement vers la différenciation plasmocytaire. Le stade pre-plasmablaste est caractérisé par de bas niveaux de sécrétion en immunoglobuline résultant de la répression des gènes codants pour XBP1 (X-box binding protein 1) et ceux de la chaîne J (joining). L'up-régulation de BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) et d'IRF4 durant le stade plasmablaste va établir les caractéristiques phénotypiques propres des cellules plasmatiques. BCL-6 et BLIMP1 vont établir une boucle mutuelle de suppression entre les centroblastes et les plasmablastes et/ou les cellules plasmatiques respectivement (Shaffer, A et al. 2002). BLIMP1 réprime PAX5 dans les plasmablastes et les cellules plasmatiques (Lin, K et al. 2002) ; la littérature montre que PAX5 peut également réprimer PRDM1 (positive-regulatory-domain-containing 1) codant pour BLIMP1 (Kallies, A et al. 2007). Cette transduction continue du signal via le CD40 est cruciale pour engager le centrocyte vers la différenciation en B mémoire, et l'expression continue de PAX va maintenir l'identité B dans ces cellules B mémoires. (D'après Klein, U., & Dalla-Favera, R. 2008)

Grâce au programme transcriptionnel approprié, le centroblaste va migrer vers la zone claire pour passer au stade de centrocyte.

IV.2 Centrocytes

Le centrocyte est une cellule B possédant les marqueurs de surface suivants : CD19+, CD38+, IgD-, CD77-, CD20high et CD44-/low. C'est une cellule qui a réussi à satisfaire les critères de sélection positive, notamment en évitant la sélection négative et qui va pouvoir subir le switch isotypique afin de devenir une cellule B mémoire ou bien un plasmocyte. Pour rappel le mécanisme de switch isotypique (cf chapitre 1) ou recombinaison de classe est initié par

l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase) qui va convertir des cytosines en uraciles dans les régions S. Elles sont situées en amont de chaque région des fragments constants de la chaîne lourde (C_H) excepté pour C δ (*Stavnezer, J., Guikema, J. E., & Schrader, C. E. 2008*). Les uraciles vont être enlevés par 2 voies de réparation de l'ADN entraînant alors des mutations, des cassures simple brin et double brins (*Stavnezer, J., & Schrader, C. E. 2014*).

Historiquement, la SHM est décrite comme ayant lieu dans la zone sombre (DZ) alors que la CSR se produit dans la zone claire (LZ). Cette distinction n'est probablement pas aussi stricte car récemment certains auteurs ont remis en compte ce concept.

Concernant l'implication de la voie NF- κ B dans le GC, les hétérodimères majoritairement retrouvés sont c-Rel/p50 et RelA/p50 (*Heise, N et al. 2014*). Que ce soit c-Rel ou RelA, elles sont toutes deux induites par l'activation du BCR après 1 à 2h post-stimulation (*Damdinsuren, B et al. 2010*). Elles peuvent ensuite induire l'expression de chimiokines, assurant la bonne interaction des cellules B avec les T. La première, CCR7 est responsable également du déplacement des cellules B à la périphérie des zones T (*Reif, K et al 2002*) tandis que CCL3 et 4 vont avoir des propriétés chimio-attractives vis-à-vis des T (*Bystry, R. S et al. 2001*). Il est possible de mieux comprendre le rôle de ces deux sous-unités lors que les cellules en sont déficitaires. Ainsi, la perte de c-Rel ne permet pas le maintien des GC. De plus, c-Rel étant fortement activé par la signalisation médiée par le BCR (*Damdinsuren, B et al. 2010*), les cellules B déficitaires seraient donc hypermutées, sélectionnées et capables d'engager un nouveau cycle de mutations en entrant de nouveau dans la zone sombre. Le lien étroit entre le BCR et l'activation de c-Rel laisse donc à penser que cette sous-unité joue un rôle prépondérant dans les processus d'affinité et de maturation. A l'inverse RelA n'a pas un rôle redondant à celui de c-Rel, c'est pourquoi son ablation n'impacte pas le maintien des GC mais résulte en une réduction du nombre de plasmocytes et une perte dans le sérum des IgG dû à la mauvaise régulation de BLIMP1 (*Heise, N et al. 2014*).

L'autre facteur de régulation du GC est c-Myc qui est connu pour sa capacité à réguler la croissance et la division cellulaire. L'expression de c-Myc est rapidement supprimée par BCL6 dans les centroblastes en division (*Klein, U et al. 2003 ; Dominguez-Sola, D et al. 2012*). Cependant, dans la zone sombre du GC, les GCB sont capables de proliférer de manière indépendante de Myc, cela est donc rendu possible par l'interaction de BCL6 avec les protéines capables d'interagir avec Myc telles que MIZ1. Ensemble, elles suppriment les programmes de transcription responsables de l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) (*Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., & Dalla-Favera, R, 2005*). Donc malgré son absence des centroblastes, c-Myc arrive tout de même à moduler l'initiation et le fonctionnement du GC. De la même manière, si une stimulation antigénique est réalisée, c-Myc peut être détecté de façon transitoire et initie le « boost » de la réponse à l'antigène des GCB. Par conséquent une perte de c-Myc avant la réalisation des immunisations défavorise la formation des GC (*Calado, D et al. 2012*). Également, c-Myc est détecté dans certains LB de la zone claire et serait impliqué dans leur capacité à entrer de nouveau dans la zone sombre. Si la perte de c-Myc a lieu dans les GCB après formation des GC cela entraîne le non-maintien de cette structure et son effondrement d'où son rôle important dans l'environnement du GC.

Il va y avoir une forte implication de la voie NF- κ B et en particulier des sous-unités c-Rel et RelA (Figure 53) dans les événements oncogéniques pouvant subvenir au stade centroblaste de la zone sombre (DZ) et centrocyte de la zone claire (LZ).

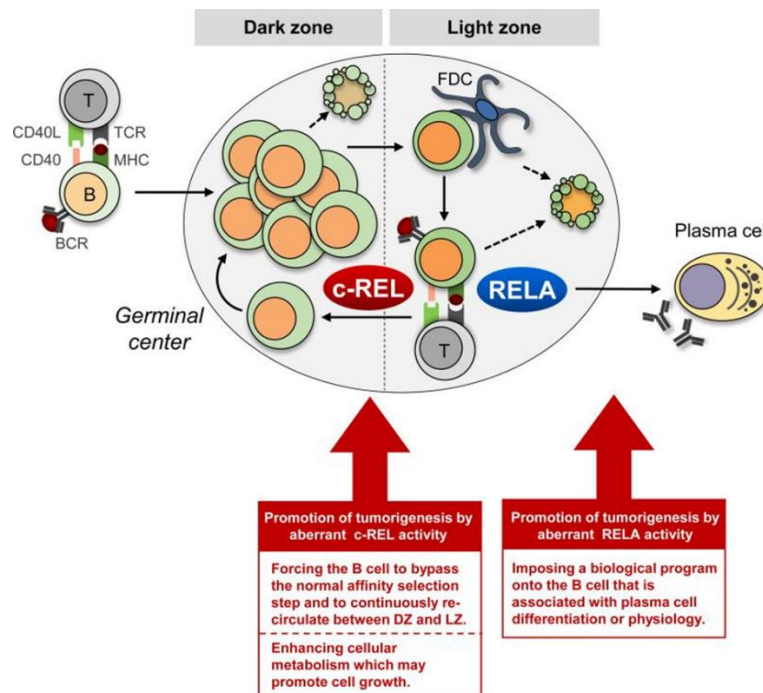


Figure 53. **Conséquences possibles d'une aberration de la voie NF- κ B**

Dû à son rôle clé dans le métabolisme et la croissance des GCB, une activité aberrante de c-Rel pourrait promouvoir la tumorigenèse en permettant aux cellules d'échapper à la sélection positive dans le GC et recirculer de façon incontrôlée entre la zone sombre et la zone claire. En revanche la sous-unité RelA a une activité dans les GCB qui pourrait quant à elle déstabiliser les processus physiologiques responsables du contrôle du développement des cellules plasmiques. Les abréviations mentionnées sur le schéma correspondent à : B – B-cell; T – T-cell; FDC – follicular dendritic cell. (D'après Klein, U., & Heise, N 2015).

Finalement, le centrocyte accèdera au stade de maturation finaux des LB, soit en tant que LB mémoires soit en tant que plasmocytes pour la production d'anticorps.

IV.3 LB mémoires

Les LB mémoires sont des cellules B post-GC CD19+, CD24high, CD38-, IgD-, CD27+, CD20+ et CD45 high. Les travaux de Mak & Saunders (Mak, T. W., & Saunders, M. E. 2006) a démontré le rôle prépondérant du CD40, CD40L, IL2, IL10 et BCL6 dans l'engagement du centrocyte vers un B mémoire versus un plasmocyte (Figure 48).

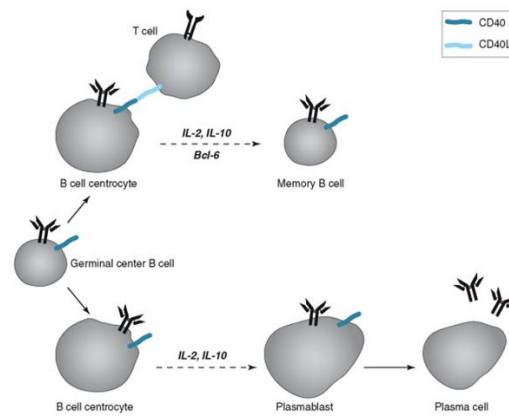


Figure 54. Processus de différenciation du centrocyte en cellules plasmatiques ou B mémoires

Après l'hypermutation somatique, la sélection et le switch isotypique, les cellules B du GC choisissent entre la différenciation en cellules plasmatiques sécrétrices d'anticorps ou une cellule B mémoire. Une cellule du GC va se différencier en B mémoire en présence d'IL-2, IL-10 et si la transduction du signal via le CD40 a induit l'expression transcriptionnelle du répresseur BCL6. En effet, l'expression de BCL6 bloque la voie de différenciation en cellule plasmatique. A l'inverse si la signalisation via le CD40 est absente, alors le centrocyte deviendra un plasmablaste puis une cellule plasmatique capable de sécréter des anticorps (D'après Mak, T. W., & Saunders, M. E. 2006).

Dans le cas du développement d'une cellule B mémoire, le processus est entièrement dépendant des cellules folliculaires dendritiques du GC, des LT et de la signalisation médiée par le CD40L. Les cellules T jouent un rôle important dans l'établissement de la mémoire immunitaire car les LB T-indépendants peuvent se différencier en plasmocytes mais n'induisent pas la génération de LB mémoires (Mak, T. W., & Saunders, M. E. 2006).

Les cellules B mémoires, constituent alors une population de LB ayant retenu le récepteur à l'antigène à leur surface tout en ayant besoin de signaux de différenciation venant du pathogène pour pouvoir activement défendre l'hôte contre les infections. L'étape de différenciation terminale des B mémoires vers le stade plasmocytes sécréteurs d'anticorps, est caractérisée par une absence de la phase de latence propre à la réponse immune primaire. Ainsi, lors de la réponse secondaire, les LB mémoires vont jouer un rôle clé dans l'induction de cette réponse immune car elles portent un récepteur antigénique de la classe des IgG à leur surface, bien qu'il existe également des populations mémoires positives pour les IgM (Wienands, J., & Engels, N. 2016). Les cellules B mémoires ont ainsi un rôle dans la réponse immune secondaire et sont primordiales dans le développement des vaccins en constituant cette mémoire immunitaire de la rencontre avec l'antigène (Palm, A. K. E., & Henry, C. 2019).

Il est important de mentionner à ce stade le rôle de BACH2 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2) qui est une cible de la sous-unité c-Rel NF-κB. BACH2 est indispensable dans le GC. Des analyses de CHIP-seq révèlent que BACH2 est aussi un gène cible de c-Rel NF-κB dans les cellules B humaines transformées. Par conséquent, le traitement des cellules du BL (Burkitt Lymphoma) par des inhibiteurs de NF-κB/IκB kinase ou la délétion de c-Rel ou RelA résulte en la perte de l'expression de BACH2 ce qui impacte la viabilité cellulaire. Ces données montrent le rôle de suppresseur de tumeur de c-Rel dans le développement du lymphome par sa capacité à réguler l'expression de BACH2 (Hunter, J. E.

et al. 2016). BACH2 est donc exprimé de façon abondante dans les GCB. En revanche son expression est réprimée dans les plasmocytes. L'expression de BACH2 est aussi médiée par PAX5 mentionné précédemment (*Schebesta, A et al.2007 ; McManus, S et al.2011*), et son niveau d'expression est augmenté dans le GC par BCL6 et c-Rel (*Alinikula, J et al. 2011*). Il y a donc ici une dynamique c-Rel/BACH2/BCL6 dans le contexte spécifique du GC. BACH2 est crucial car il va assurer la répression de BLIMP1 est donc l'engagement vers la différenciation plasmocytaire bloquée par l'axe PAX5/BCL6. A la sortie du GC, lorsque BCL6 n'est plus exprimé, BACH2 soutient l'engagement vers le compartiment B mémoire. Les GCB déficientes pour BACH2 ont des niveaux anormaux d'expression de BLIMP1 mais aussi des défauts d'induction d'AID entraînant des problèmes de CSR (*Muto, A et al.2010*). De façon plus détaillée, l'inhibition de BLIMP1 par BACH2 peut se faire grâce à son interaction avec MAFK (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue K). La reconnaissance des séquences ADN par MAFK dans le promoteur de BLIMP1 supprime son expression (*Huang, C et al.2014 ; Oyake, T., Itoh, K et al. 1996*). De plus les interférons IF4 et 8 sont des acteurs de la régulation de l'environnement du GC. Dans ce contexte, de hauts niveaux d'expression d'IRF4, causés par une signalisation du BCR accrue, sont nécessaires afin de contre balancer les fonctions répressives de BACH2 et induire l'expression de BLIMP1 pour assurer la poursuite de la différenciation (*Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A., & Muto, A. 2014*).

IV.4 Plasmocytes à longue durée de vie

Comme les cellules plasmiques à longue durée de vie représentent le stade de différenciation terminale de la lignée B, elles possèdent le niveau de spécificité le plus haut et des caractéristiques cellulaires et morphologiques visibles sous microscope. A noter que les plasmocytes à longue durée de vie sont capables d'exprimer un programme d'expression génique propre et qu'elles produisent un grand taux d'anticorps tout au long de la vie de l'hôte (*Nutt, Stephen L., et al. 2015*).

Les cellules plasmiques, à la différence des cellules B mémoires, sont CD19+, CD24 -/low, CD38 high, IgD-, CD77-, CD20+ et CD138+. Comme mentionné ci-dessus, elles font partie des stades de différenciation terminale de la cellule B et participent comme les B mémoires dans l'induction de la réponse secondaire (Figure 55). Les travaux de Hammarlund et al (*Hammarlund, E et al. 2017*) ont démontré que les plasmocytes marqués au BrdU+ pouvaient persister dans l'organisme 10 ans après l'administration du BrdU ou lors d'une vaccination. Les plasmocytes à longue durée de vie représentent ainsi une population responsable de l'établissement de la production d'anticorps sur la durée et assurant une mémoire sérologique soit la persistance à long terme de titres d'anticorps spécifiques dans le corps.

Les plasmocytes sont la pièce maîtresse de l'immunité humorale. La transition du B folliculaire vers un plasmocyte se fait notamment grâce à des changements morphologiques mais également des changements au niveau de l'architecture du noyau. Ainsi le développement de ces cellules se fait de manière concomitante avec des interactions génomiques de type gain d'euchromatine dans les loci codants la différenciation spécifique en plasmocytes incluant PRDM1 et ATF4. Il existe également l'établissement de nouvelles interactions inter-chromosomales à ce moment de la différenciation impliquant les histones H3K27Ac ou H3K27me3 (*Bortnick, A et al. 2020*).

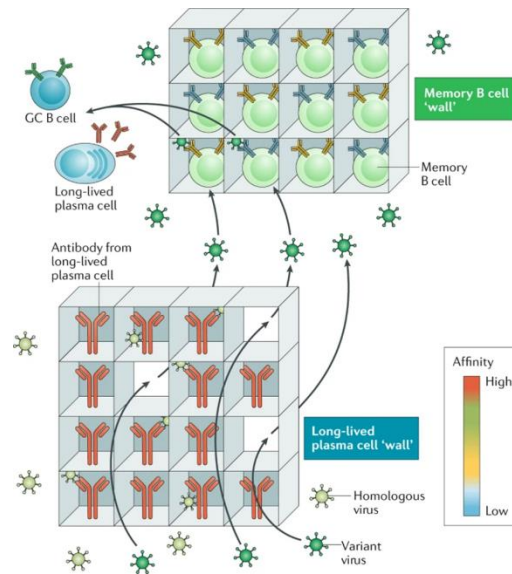


Figure 55. Rôles des cellules plasmatiques à longue durée de vie et des B mémoires dans la réponse immune secondaire

Les cellules plasmatiques à longue durée de vie dans la moelle osseuse vont sécréter des anticorps de haute affinité et de haute spécificité (en rouge) formant le premier rempart (en bas du schéma) contre les secondes infections par des pathogènes homologues. Les variants de ces mêmes pathogènes sont retrouvés dans les trous de ces remparts ; cependant ceux qui échappent aux anticorps sécrétés par les plasmocytes à longue durée de vie, se heurtent au second rempart (en haut du schéma) formés par les cellules B mémoires. Cependant, celles-ci ont subi une pression de sélection moins forte et possèdent donc des affinités et des spécificités variées pour l'antigène. Les B mémoires sont justement activées par ces variants de pathogènes et se différencient en cellules plasmatiques à longue durée de vie et pénètrent de nouveau dans le centre germinatif pour réapprovisionner le pool de cellules B mémoires. (D'après Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. 2020)

La longévité est donc la marque caractéristique des plasmocytes à longue durée de vie. Cette propriété est conférée par les signaux médiés de façon continue par la niche de survie dans la moelle osseuse. Ce sont des signaux faisant intervenir une régulation accentuée du facteur anti-apoptotique MCL-1 et l'activation de récepteur CD28 exprimés sur ces plasmocytes à longue durée de vie. Les signaux de type BCMA (récepteur appartenant aux TNF), l'augmentation du facteur de transcription ZBT20 et de l'enzyme ENPP1 participent aussi au maintien de ces cellules. Un autre aspect important à prendre en compte est le paramètre de forme métabolique ou « metabolic fitness » qui explique cette longévité par l'optimisation du glucose pour générer du pyruvate durant les périodes de stress métaboliques afin de favoriser la survie à long terme. L'autre acteur majeur est le microenvironnement ainsi que la niche de survie. En effet de nombreux partenaires cellulaires comme les cellules stromales, les cellules dendritiques et les cellules T régulatrices vont établir une niche pour les plasmocytes à longue durée de vie. Cet environnement favorable à la survie se fait par l'expression de ligands comme le CD80/86 pour CD28 et la production de facteurs solubles et stromaux contribuant à la longévité des cellules. Il existe donc des mécanismes à la fois intrinsèques et extrinsèques requis pour la longévité des cellules plasmatiques à longue durée de vie (pour revue Lightman, S. M., Utley, A., & Lee, K. P. 2019).

Nous avons donc pu voir dans ce chapitre, le développement de la cellule B de la moelle osseuse vers les compartiments périphériques. A chaque point du développement B, nous avons pu faire le lien avec la voie clé NF- κ B au cœur de ce projet de thèse. En conditions physiologiques donc, un précurseur B donne successivement un pro-B, un pre-B, une cellule B immature, un B transitionnel, une cellule B naïve pouvant entrer dans le GC afin de poursuivre son développement au stade centroblaste, centrocyte puis atteindre les stades de différenciation terminale le LB mémoire ou le plasmocyte à longue durée de vie.

Cependant, en raison des nombreuses modifications physiologiques, morphologiques et génétiques de cette cellule B en maturation, les différentes étapes du développement constituent un environnement propice aux évènements oncogéniques et ce notamment en lien avec la voie NF- κ B. Du fait de son rôle crucial dans l'inflammation, la réponse immune, divers processus physiologiques et l'implication clé de ses sous-unités activatrices RelA et c-Rel, beaucoup d'anomalies du développement B sont retrouvées associées à une activité aberrante de NF- κ B (Figure 56).

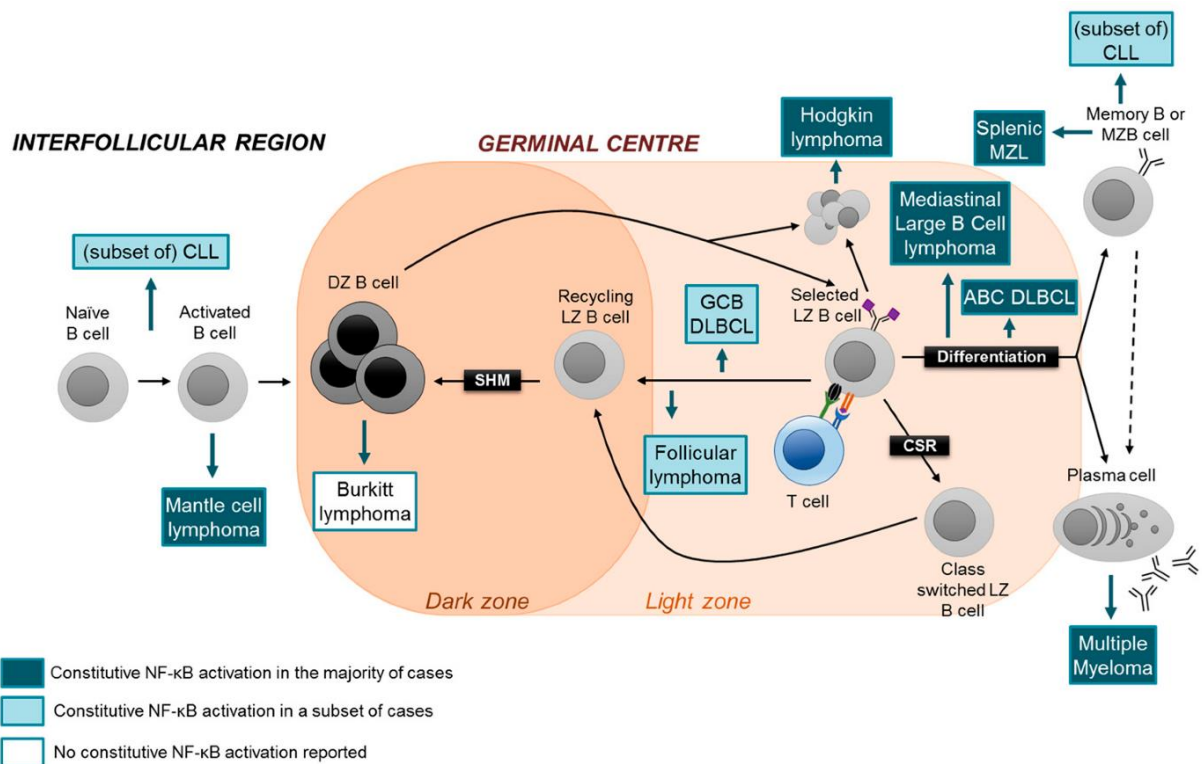


Figure 56. Développement des cellules GCB et pathologies associées à une activité aberrante de NF-κB

Alors que les Lymphomes de Burkitt (Burkitt Lymphoma BL) semble tirer leur origine de la transformation de cellules au niveau de la zone sombre (DZ), des études récentes suggèrent que les lymphomes folliculaires (Follicular Lymphoma FL) et les lymphomes B diffus à grandes cellules du centre germinatif (GCB-DLBCL Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma) dériveraient d'une transformation cellulaire au niveau de la zone claire. Le sous-type ABC-DLBCL sous type activé (Activated Diffuse Large B Cell Lymphoma) surviendrait au niveau de la zone claire pour des cellules engagées vers la différenciation plasmocytaire. Le lymphome du Manteau (Conventional mantle cell lymphoma MCL) dérive quant à lui d'une transformation oncogénique d'une cellule pre-GCB activée par un antigène. Le Myelome Multiple (MM) est une tumeur survenant au stade plasmocytaire. Le lymphome de Burkitt semble avoir lieu au niveau de la zone claire avec des récepteurs antigéniques paralysés. Les lymphomes B à larges cellules du médiastin (Mediastinal Large B Cell Lymphoma MLBCL) émergent au moment de la différenciation au niveau de la zone claire tandis que les lymphomes de la zone marginale d'une différenciation post GC ou B mémoire. Enfin, la leucémie lymphoïde chronique (Chronic Lymphocytic Leukemia CLL) peut à la fois avoir ou non des mutations sur les gènes IgV. Plusieurs pathologies B sont associées à des degrés d'activité de la voie NF-κB plus ou moins forts comme indiqué en bas du schéma. (D'après Kennedy, R., & Klein, U. 2018)

Nous allons donc voir dans le chapitre 3, les pathologies associées à des défauts au niveau du développement des LB et en particulier ceux impliquant la voie NF-κB.

Chapitre 3 Activité aberrante de la voie NF- κ B et anomalies du développement B

Au cours du chapitre 1 et 2, nous avons pu voir comment la voie de signalisation NF- κ B était intimement liée au bon développement de la cellule B. En conditions physiologiques et ce du stade médullaire aux centres germinatifs, NF- κ B va moduler la prolifération et la maturation des cellules. Cela explique pourquoi cette voie est également corrélée à des anomalies du développement B. Nous allons donc développer dans ce chapitre 3 le cas des lymphomes B et en particulier le lymphome qui fait l'objet de cette thèse, le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules du Centre Germinatif ou Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma (GCB-DLBCL).

I. Lymphomes Non-Hodgkiniens

Un développement défectueux du LB peut entraîner un ensemble de pathologies variées comme des cancers et en particulier des lymphomes, des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, des maladies inflammatoires non auto-immunes comme le diabète de type 2, des problèmes de rejets de greffes dans le cas des transplantations, une propagation facilitée du VIH (Virus Immunodéficience Humaine) ou encore des pathologies propres aux immunoglobulines. Dans le cadre de ces travaux de thèse nous nous intéressons au premier type de défaut B mentionné, le cas des lymphomes.

Les lymphomes B représentent un groupe de cancer du système lymphatique incluant les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et la moelle osseuse. Les lymphomes peuvent donc affecter tous ces organes et ce à travers le corps entier.

Les lymphomes B se divisent en deux sous-catégories les Lymphomes dits Hodgkiniens (Hodgkin Lymphoma, HL) et les Lymphomes B Non-Hodgkiniens (B-cell Non-Hodgkin Lymphoma, B-NHL), ces derniers seront développés ci-après.

Les B-NHL représentent un ensemble de pathologies pouvant varier au niveau du caractère indolent du cancer jusqu'à son stade le plus agressif. Les B-NHL vont dériver de lymphocytes B à différents stades de développement et les caractéristiques de chaque B-NHL vont être propres au stade cellulaire de maturation de la cellule d'origine (*Armitage, J. O et al. 2017*).

I.2.1 Généralités

Une suspicion de B-NHL est posée dans un contexte où de larges ganglions lymphatiques sont observés via une radio ou bien un examen clinique. Cependant, le diagnostic final de B-NHL va être rendu seulement après l'analyse d'une biopsie de tissu.

Le B-NHL de haut-grade le plus commun est le DLBCL (Diffuse Large B Cell Lymphoma) dont les deux sous-types seront développés au cours de ce chapitre 3. Le DLBCL est une pathologie agressive curable dans 60 à 70% des cas avec une stratégie de combinaison d'immunochimiothérapie. A l'inverse, le grade le plus indolent des B-NHL est le Lymphome Folliculaire (FL pour Follicular Lymphoma), non curable avec de nombreuses phases de rechutes/rémission qui exigent un traitement dont la durée est indéterminée (*Al-Naeeb, A. B., Ajithkumar, T., Behan, S., & Hodson, D. J. 2018*).

I.2.2 Origine

La cellule d'origine permet une classification des lymphomes B ainsi que sa prise en charge thérapeutique selon son degré d'agressivité (Figure 57).

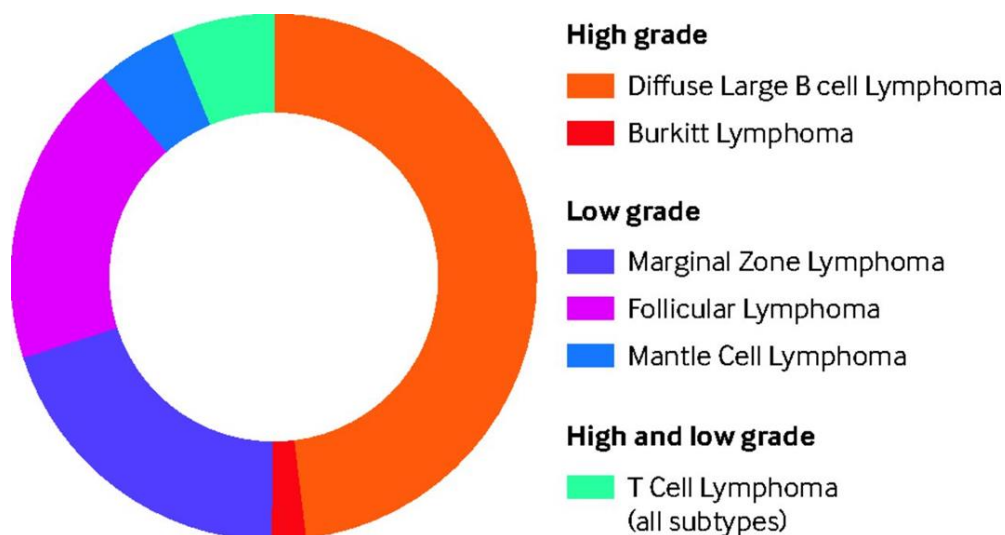


Figure 57. **Incidence relative des catégories majeures de NHL (d'après les données de Smith, A et al. 2015)** (D'après Al-Naeeb, A. B., Ajithkumar, T., Behan, S., & Hodson, D. J. 2018).

Représentation schématique de l'incidence des NHL en fonction du grade (high, low ou high et low) et du type de lymphomes (DLBCL, Burkitt, MZL, FL, MCL, TCL).

Ainsi, du plus haut-grade de B-NHL au moins haut on retrouve les DLBCL, le Lymphome de Burkitt (BL Burkitt Lymphoma), le Lymphome de la Zone Marginale (MZ Marginal Zone), le Lymphome Folliculaire, et le Lymphome du Manteau.

Concernant les DLBCL, une partie de ce chapitre sera consacrée aux 2 sous-types majeurs les ABC-DLBCL et les GCB-DLBCL.

Le BL est une pathologie agressive des cellules B pouvant affecter aussi bien les enfants que les adultes. L'étude du BL a menée à l'identification d'une aberration chromosomique récurrente, la translocation $t(8;14)(q24;q32)$ et la découverte du rôle central de MYC et de l'EBV (Epstein-Barr virus) dans les processus du tumorigenèse. La plupart des patients peuvent être soignés par chimiothérapie mais ceux qui vont rechuter ou sont réfractaires aux traitements meurent de ce type de lymphome (pour revue López, C et al. 2022).

Les MZ (pour revue Cheah, C. Y., Zucca, E., Rossi, D., & Habermann, T. M. 2022) représentent un des sous-types les plus prépondérant de lymphomes indolents à raison de 7% des NHL aux USA (Reid, R., & Friedberg, J. W. 2013 ; Sriskandarajah, P., & Dearden, C. E. 2017 ; Cerhan, J. R., & Habermann, T. M. 2021). Au sein même des MZ sont retrouvés 3 sous-types différents : les MZ extranodaux associés au tissus lymphoïdes de la muqueuse ou MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) concernant 50 à 70% des cas de MZ, les MZ de la rate (20%) et les MZ nodaux (10%) (Campo, E et al.2008 ; Zucca, E., & Bertoni, F. 2016).

Pour le FL (*pour revue Jacobsen, E. 2022*), il est indolent et est caractérisé par des proliférations aberrantes de LB et en particulier de cellules folliculaires B transformées du GC. Le FL présente des lymphadénopathies diffuses et des défauts au niveau de la moelle osseuse accompagnés d'une splénomégalie. L'atteinte extra-nodale est peu fréquente en revanche les cytopénies sont régulièrement observées. Des symptômes de fièvre, des sueurs nocturnes et de perte de poids sont décrits en cas de transformation du FL en DLBCL.

Le ML quant à lui, est un lymphome moins fréquent caractérisé par une grande hétérogénéité et pouvant être indolent et évoluer en pathologie agressive. Les ML (*pour revue Armitage, J. O., & Longo, D. L. 2022*) tirent leur appellation de l'expansion survenant au niveau de la zone du manteau (*Weisenburger, D. D., Kim, H., & Rappaport, H. 1982*). Les caractéristiques immunophénotypiques de ce lymphome sont les suivantes : CD5+, CD10-, Bcl-2+, Bcl-6-, CD20+ accompagné de la translocation chromosomique t (11 ;14) (q13; q32) et l'expression de la cycline D1.

Par ailleurs, les différents sous-types/grades de B-NHL peuvent être associés à différents facteurs ou agents environnementaux comme les infections, des états d'immunodéficience ou encore des inflammations chroniques (*pour revue Sapkota, S., & Shaikh, H. 2020*). Parmi ces facteurs nous pouvons citer :

- L'EBV pouvant favoriser la survenue de certains B-NHL comme le BL.
- Le virus de l'hépatite C « Hepatitis C virus » (HCV) favorise l'expansion clonale B. HCV est également en lien avec les MZ de la rate et les DLBCL.
- L'« Human herpesvirus 8 » (HHV8) est associé avec le lymphome primitif des séreuses ou « primary effusion lymphoma » (PEL) qui est un des B-NHL rare associé au sarcome de Kaposi.
- L'infection par *Helicobacter pylori* est associée à un risque de cancer de la muqueuse gastrique de type (MALT)

Certains médicaments comme la phénytoïne, la digoxine ou les antagonistes aux TNF sont associés aux NHL. De la même façon, certains composés organiques chimiques, des pesticides, des phénoxy-herbicides, des agents de préservation du bois, la poussière, les colorations pour cheveux, les solvants, une chimiothérapie et ou encore une exposition aux radiations peuvent être associés au développement de B-NHL (*Zhang, Y., Kim, C., & Zheng, T. 2012 ; Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., & Åkerman, M. 2008*).

De plus, certains états d'immunodéficiences congénitales peuvent être en association avec un risque accru de NHL comme le syndrome de Wiskott-Aldrich, et les déficits immunitaires combinés sévères SCID (severe combined immunodeficiency disease). De la même façon, les patients atteints du VIH peuvent avoir certains types de lymphome du système nerveux central. Un risque accru de B-NHL est aussi observé en cas d'immunodépressions induites par des médicaments immunosuppresseurs

Enfin, certaines maladies auto-immunes comme le syndrome de Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde et la thyroïdite de Hashimoto sont associées avec un haut risque de survenue d'un NHL. La thyroïdite de Hashimoto est associée aux lymphomes primaires touchant la thyroïde (*Anderson, L. A et al.2009*). Concernant la maladie de Celiac, elle est également associée à un risque élevé de développer un NHL.

Avec l'évolution des techniques d'investigation et de classification des cancers, il est alors possible de remonter à la cellule cancéreuse d'origine et mettre en lumière les mutations clés

et événements oncogéniques conduisant aux cancers de type B-NHL. Parmi ces événements oncogéniques, la voie NF- κ B possède des fonctions majeures dans les processus de tumorigenèse associées aux B-NHL et en particulier au DLBCL.

1.2.3 Implications de la voie NF- κ B dans la survenue des B-NHL

Que les lymphomes soient de type HL ou non HL, la dérégulation de la voie NF- κ B (Table 2) est intimement liée à ces pathologies (*pour revue Jost, P. J., & Ruland, J. 2007*). Dans la littérature, il est mentionné que NF- κ B est retrouvée constitutivement activée dans des lignées cellulaires de HL (*Bargou, R. C et al. 1996*) mais également dans les cellules de Reed Sternberg (*Bargou, R. C et al. 1997*). Nous avons également mentionné (Figure 56) dans le chapitre 2, la corrélation entre une activité plus ou moins constitutive de NF- κ B et la survenue d'un type de lymphome en fonction des stades de différenciation B. Ainsi, les lymphomes ayant une activation constitutive de NF- κ B sont les ML, les HL, les lymphomes du médiastin, les MZL, les ABC-DLBCL et les myélomes multiples. Ceux ayant une activité plus modérée de NF- κ B sont certaines CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia), les FL et les GCB-DLBCL. Le cas particulier des GCB-DLBCL sera développé dans le premier travail de la thèse. Enfin un lymphome n'exhibe pas d'activité constitutive ou aberrante de la voie NF- κ B, le BL (*Kennedy, R., & Klein, U. 2018*).

Lymphoma subtype	Mechanisms of deregulation of classical NF- κ B signaling	Mechanisms of deregulation of alternative NF- κ B signaling
Hodgkin	Signals from RANK, CD30, or CD40 activate IKK via TRAFs; EBV protein LMP1 mimics CD40 signaling; inactivating mutations of I κ B α / ϵ	CD30, CD40, or EBV LMP1 use TRAFs to activate NIK
MALT-NHL	t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32), and t(14;18)(q32;q21) cause IAP2-MALT1, BCL10, or MALT1 deregulation, which activates the IKK complex	—
ABC-DLBCL	Upstream activation of IKK via CARMA1-, BCL10-, and MALT1-dependent mechanisms	Rare mutations of p100
PEL	KSHV protein vFLIP interacts with IKK γ and activates IKK complex	—
ATL	HTLV-1 TAX binds to IKK γ and activates IKK complex	Processing of p100 by HTLV-1 TAX

Table 2. Mécanismes moléculaires de l'activation dérégulée de NF- κ B via la voie de signalisation classique ou alternative dans les sous-types distincts de lymphomes

Hodgkin indique *Hodgkin Lymphoma*; *ABC-DLBCL*, *activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma*; *MALT-NHL*, *marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphatic tissue*; *PEL*, *primary effusion lymphoma*; *ATL*, *adult T-cell lymphoma/leukemia*; —, *none*. (D'après *Jost, P. J., & Ruland, J. 2007*).

Dans le cas du MALT, les translocations chromosomiques des molécules de signalisation NF- κ B entraînent l'expansion de la tumeur de manière indépendante à l'antigène. En effet, le facteur FOXP peut coopérer avec NFAT ou NF- κ B (*Wu, Y et al. 2006 ; Bettelli, E., Dastrange, M., & Oukka, M. 2005*) et FOXP1 en particulier est responsable du contrôle des premiers stades de développement B en régulant l'expression de gènes impliqués dans les processus de recombinaison.

Dans la partie DLBCL, nous verrons qu'une activité aberrante de NF- κ B est déterminante dans l'attribution d'un mauvais pronostic.

De plus, les oncoprotéines virales associées à l'EBV ou HHV8 peuvent activer NF- κ B (Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S., Said, J. W., & Knowles, D. M. 1995).

De la même façon, une revue de Packham (Packham, G. 2008) souligne ce lien entre la survenue d'une pathologie B et le niveau d'activité de NF- κ B et en particulier pour la voie canonique (Figure 58).

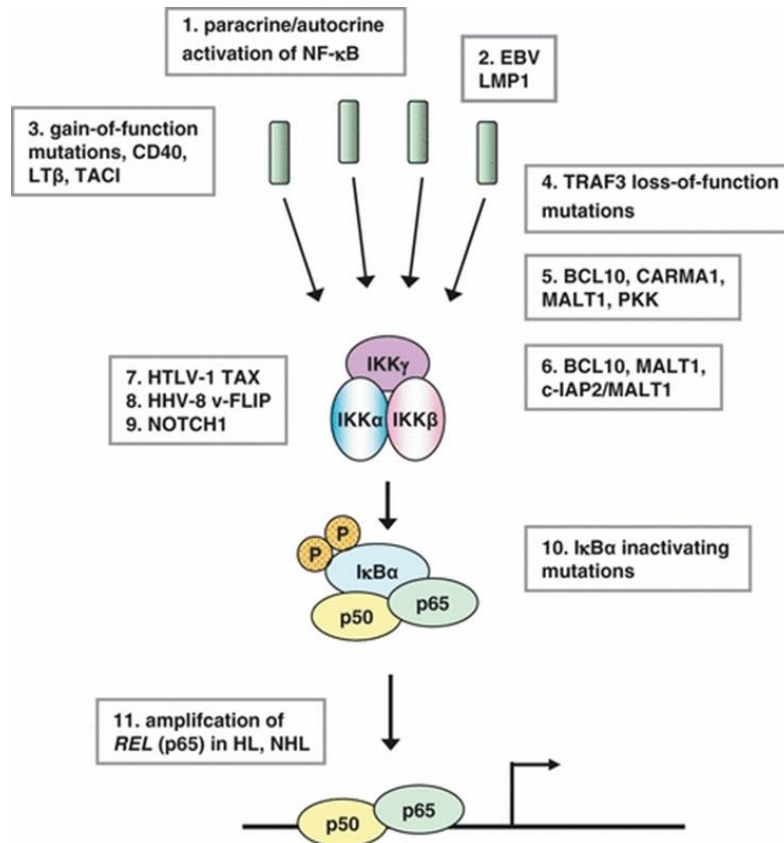


Figure 58. Mécanismes d'activation de la voie NF- κ B dans les pathologies

Sur le schéma sont mentionnés les mécanismes d'activation de la voie canonique incluant : paracrine/autocrine signalling, e.g., via CD30, CD40 and/or RANK in Hodgkin lymphoma (HL), and IL-6 and/or BAFF receptors in multiple myeloma (MM) (1); expression of LMP1 in EBV positive HL (2); gain-of-function mutations of CD40, LT β and TACI (3) and loss-of-function mutations of TRAF3 (4) in MM; signalling via BCL10, CARMA1, MALT1, protein kinase C-associated kinase in ABC-DLBCL (5); BCL10, MALT1 activation by translocation in MALT lymphoma (6); binding and activation of IKK by human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) TAX in adult T-cell lymphoma/leukaemia (ATL) (7), HHV8 v-FLIP in primary effusion lymphoma (PEL) (8) and NOTCH1 in T-ALL (9); inactivating mutations of I κ B α in HL (10); and amplification of REL in HL and non-Hodgkin lymphomas (NHL) (11) (D'après (Jost et Ruland. 2007).

Nous verrons dans les premiers résultats de cette thèse que certaines sous-unités NF- κ B peuvent constituer les sous-unités pivot d'un type de lymphome en particulier : c-Rel avec le GCB-DLBCL.

I.2.4 Traitement

De façon générale, le type de traitement classique d'une pathologie comme les B-NHL se fait par administration du R-CHOP, combinant le Rituximab avec les agents thérapeutiques regroupés sous l'appellation CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone). Cette chimiothérapie va alors pouvoir soigner 60% des patients environ mais le problème majeur reste les rechutes ou les patients réfractaires (*Jacoboni, G., Zucca, E., Ghielmini, M., & Stathis, A. 2018*). C'est pourquoi il y a un besoin crucial d'adapté la prise en charge des NHL vers des thérapies plus ciblées se basant notamment sur la cellule cancéreuse d'origine et les processus oncogéniques. La stratégie de ciblage des voies oncogéniques, comme NF- κ B, apparaît alors comme une piste de recherche très prometteuse.

II. Lymphomes B diffus à grandes cellules

II.1 Généralités

Les DLBCL représentent le type le plus fréquent de B-NHL et vont englober un ensemble de lymphomes. Les DLBCL dérivent d'un précurseur B néoplasmiq ue périphérique. La plupart des tumeurs DLBCL sont TdT⁺ CD19⁺ CD79a⁺ CD22⁺ CD20^{+/+} CD10^{+/+} HLA-Dr⁺SIg⁻ cMu^{+/+} CD34^{+/+} et peuvent également coexprimer CD13 et ou CD33 dans certains cas d'après Janossy et al. (*Janossy et al. 1980*). Les DLBCL contiennent de larges cellules dont le noyau à environ deux fois la taille d'un lymphocyte B normal et est plus gros que la taille d'un noyau de macrophage. La plupart de ces cellules ont la morphologie d'un centroblaste c'est-à-dire une cellule B du centre germinatif tandis que certaines arborent des caractéristiques propres aux immunoblastes constituant les précurseurs des cellules lymphoïdes. L'immunophénotype des DLBCL est : SIg^{+/+}, CIg^{+/+}, « B-cell-associated antigens⁺ » (CD19, CD20, CD22, CD79a), CD45^{+/+}, CD5^{-/+}, CD10^{-/+} d'après les études de Stein et al.1984 ; et Doggett et al.1984 (*Stein et al.1984 ; Doggett et al.1984*).

II.2 Classification

Avec les progrès scientifiques, la classification a pu s'affiner par l'étude du profil génétique de chaque type de DLBCL. Dans les années 2000, Alizadeh et al (*Alizadeh et al.2000*) identifient le profil génétique GEP (Gene Expression Profiling) de 96 lymphocytes normaux ou issus de DLBCL et isolent 3 clusters uniques exhibant des signatures spécifiques corrélées aux analyses COO (Cell of Origine). Communément, on distingue 2 sous-types clés de DLBCL, les ABC-DLBCL pour « Activated Diffuse Large B Cell Lymphoma » et les GCB-DLBCL pour « Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma ». Mais depuis quelques années, l'analyse du profil génétique a mis en évidence des clusters de gènes différentiels permettant une classification plus précise des tumeurs DLBCL (Figure 59) (*Roschewski, M., Phelan, J. D., & Wilson, W. H. 2020*). Les DLBCL peuvent être classés selon leur cellule d'origine, selon leurs altérations génétiques : Classification de Schmitz BN2, EZB, MCD, N1 (*Schmitz, R et al 2018*) ; Classification de Chapuy C1 à C5 (*Chapuy, B et al. 2018*) ; Classification de Lacy NOTCH2, BCL2, TET2/SGK1, SOCS1/SGK1, et MYD88 (*Lacy, Stuart E., et al. 2020*) et la classification de Wright BN2, A53, EZB-MYC+, EZB-MYC-, ST2, MCD, N1 (*Wright, George W., et al. 2020*).

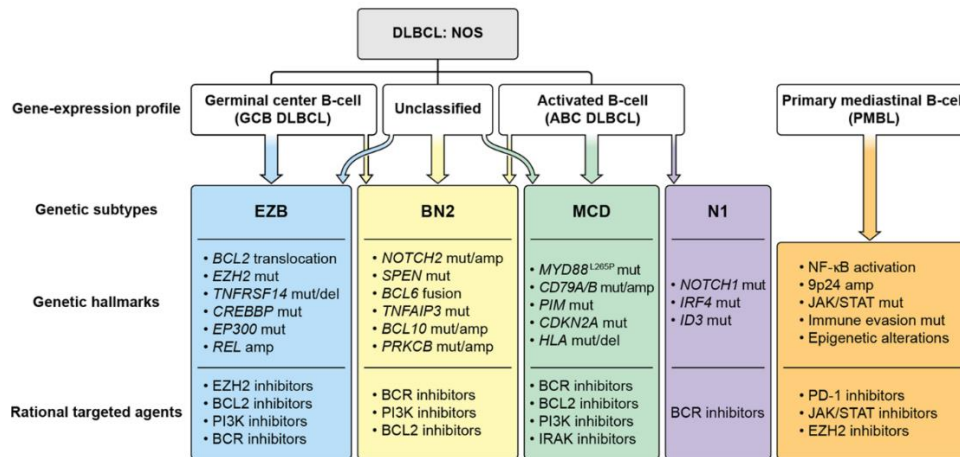


Figure 59. Mécanismes oncogéniques et cibles thérapeutiques des différents sous-types de DLBCL

Les DLBCL peuvent être classés selon le profil d'expression des gènes et notamment par la détermination du phénotype cellulaire d'origine ou COO (Cell Of Origin). Les gènes surexprimés dans ces sous-types correspondent à différents stades de développement B dont dérive la tumeur. Dans les DLBCL NOS (Not Otherwise Specified) ou non spécifiés il existe 2 phénotypes clés. Le GCB-DLBCL dérive d'une cellule B surexprimant des gènes associés aux réactions de centre germinatif tandis que les ABC-DLBCL dérive d'une cellule au stade post GC avec un phénotype B activé. Les cas restants, environ 15-20% de DLBCL comprennent les DLBCL NOS non classifiés par le profil COO. En revanche le Lymphome du Médiastin (Primary Mediastinal B Cell Lymphoma PMBL), se distingue des DLBCL : les formes NOS ou dérivées des rares cellules B post thymus ont une signature unique qui ressemble au HL comparée aux autres sous-types de DLBCL. Dans les DLBCL on distingue 4 sous-types : les NOS regroupent un ensemble de marqueurs génétiques et de mécanismes oncogéniques. Le sous-type EZB (bleu) est un GCB-DLBCL et est associé à des translocations BCL2, mutations EZH2 et amplification de REL (en lien avec NF-κB). Il existe également des inactivations de TNFRSF14, CREBBP et EP300. Les stratégies de thérapies ciblées sont alors axées sur les inhibiteurs d'EZH2 ou BCL2 ou bien les inhibiteurs proximaux du BCR ou de la voie PI3K. Le sous-type BN2 (jaune) est retrouvé dans les GCB, ABC et cas non classés de DLBCL. Parmi les marques génétiques retrouvées dans ce sous-type il y a des fusions BCL6 et des altérations de la voie NOTCH. Le ciblage thérapeutique repose alors sur des inhibiteurs de BCR ou de PI3K mais aussi des inhibiteurs de BCL2. Le sous-type MCD (vert) est caractérisé par les mutations MYD88^{L265P} et CD79B, il est quasiment toujours ABC-DLBCL. Au niveau des altérations génétiques on retrouve des défauts sur HLA-A, HLA-B ou HLA-C qui vont contribuer à l'échappement immunitaire. Le ciblage thérapeutique consiste à inhiber la Bruton Tyrosine Kinase, PI3K, BCL2 et IRAK4. N1 (violet) est quasi exclusivement un ABC-DLBCL et est caractérisé par des mutations NOTCH1. On préférera alors des agents thérapeutiques inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR. Le PMBL (orange) est caractérisé par une activation de NF-κB et une amplification du chromosome 9p24 codant pour de multiples gènes augmentant la signalisation via JAK/STAT incluant PDL1, PDL2 et JAK2. Inhiber la voie PD1 semble alors une bonne stratégie de ciblage dans le cas du PMBL. En effet de nombreux événements mutagènes peuvent promouvoir l'échappement immunitaire et ce particulièrement dans le cas du PMBL comme les translocations CIITA et des mutations EZH2 réduisant l'expression du CMHI et II. Abréviations mentionnées sur le schéma : DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; NOS, not otherwise specified; mut, mutations; del, deletions; amp, amplifications; NF-κB, nuclear factor-κB; JAK/STAT, janus activating kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway; BCR, B-cell receptor signaling pathway; IRAK4, interleukin-1 receptor-associated kinase 4; PD-1, programmed cell death-1 pathway; Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (D'après Roschewski, M., Phelan, J. D., & Wilson, W. H. 2020).

C'est pourquoi, le ciblage de ces voies mais en particulier le focus sur des mutations clés de ces mêmes voies représente un large champ de recherche dans le but de développer de nouvelles thérapies ciblées dans le DLBCL.

II.4 Traitement

Comme mentionné plus haut, la plupart des patients atteints de DLBCL seront traités par thérapie R-CHOP. La Figure 61, expose ainsi les dernières recommandations (2022) de prise en charge du DLBCL avec un stade d'évolution dans le temps limité, cas le plus favorable (Rojek, A. E., & Smith, S. M. 2022)

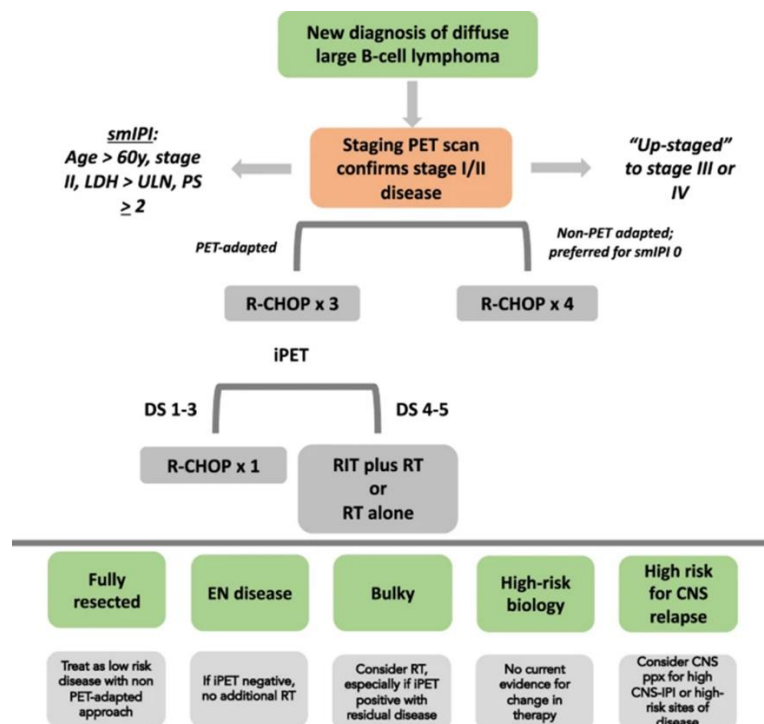


Figure 61. **Prise en charge thérapeutique des DLBCL** (D'après Rojek, A. E., & Smith, S. M. 2022)

Sont mentionnées sur l'organigramme les abréviations suivantes : iPET interim PET, smIPI stage modified IPI, RIT radioimmunothérapie, DS Deauville score, ppx prophylaxis, PS performance status, ULN upper limit normal

Malgré une bonne efficacité globale de R-CHOP, environ 30 à 40% de patients feront une rechute ou ne répondront pas au traitement. Dans le cas des DLBCL cela reste une cause majeure de morbidité et de mortalité dû au nombre limité d'options thérapeutiques (Camicia et al.2015).

Mon sujet de thèse portant sur le GCB-DLBCL, nous allons poursuivre ce chapitre en abordant dans un premier temps le sous-type ABC-DLBCL puis nous terminerons par le GCB-DLBCL.

III. ABC-DLBCL

Le profil d'expression du sous-type ABC-DLBCL suggère que la cellule d'origine est une cellule B orientée vers une différenciation plasmocytaire (*Rosenwald, A et al. 2002*). Comparés aux GCB-DLBCL, les ABC vont voir leurs gènes propres à l'environnement du centre germinatif être « down » régulés. En revanche, les gènes responsables des caractéristiques phénotypiques des cellules plasmiques vont voir leur expression augmentée dans le sous-type ABC (*Wright, G et al. 2003*).

III.1 Généralités

De façon générale, un DLBCL qu'il soit ABC ou GCB peut toucher différents endroits du corps humain. Au niveau de l'intestin, le DLBCL peut causer des nausées, des vomissements, des diarrhées, des constipations, la présence de sang dans les selles et des pertes d'appétit. Au niveau du système nerveux central, il peut se produire des phénomènes de confusion, de perte de mémoire, de crises de césure mais cela peut se manifester également par des sensations de picotements au niveau des bras et des jambes. Concernant un développement de DLBCL au niveau de la poitrine, la pathologie peut entraîner un essoufflement, des douleurs ainsi qu'une toux sèche. Si la moelle osseuse est atteinte, des phénomènes de cytopénie entraînent là aussi une baisse de la capacité respiratoire, une recrudescence d'infections et des difficultés à éliminer les pathogènes et enfin des saignements ou des bleus. De plus, au niveau de la peau, les patients DLBCL sont sujets à des irritations, des gonflements et des démangeaisons plus ou moins intenses.

Par ailleurs, une classification COO établie selon des marquages immuno-histochimiques a permis la mise en place de l'algorithme de Hans (*Hans, C. P. et al. 2004*) puis de Muris (*Muris, J. J. F et al 2006*) afin d'aboutir à une version finale de classification histologique (Figure 62). Ainsi on distinguera les GCB-DLBCL des non-GCB dont font partie les ABC-DLBCL (*Nyman, H et al. 2009*)

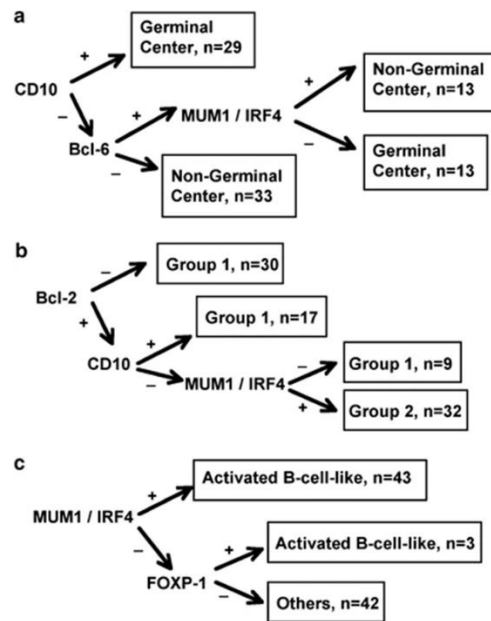


Figure 62. **Classification Immunohistochimique de la COO**

(a) Classification de Hans ; (b) Classification de Muris, (c) Algorithme de la cellules B activée modifié (D'après Nyman, H et al. 2009)

Ainsi, des cellules issues du sous-type ABC-DLBCL seront larges et FOXP1 positives mais négatives pour le CD10 comme le montre ces images (Figure 58) tirées de l'étude de van den Brand et al (van den Brand et al. 2016).

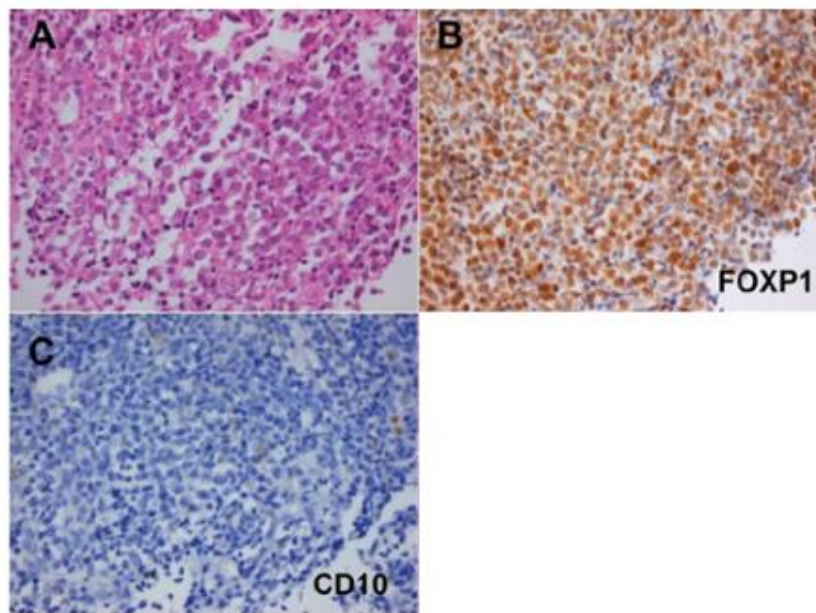


Figure 63. **Marquages Immuno histochimiques HES, CD10 et FOXP1 de tumeurs non GCB**

Les images (A) et (C) montrent un tissu de patient atteint d'un Lymphome de la Zone Marginale Nodal transformé en DLBCL, coloration HES Hematoxylin & eosin. (A) Les cellules tumorales sont larges, positives pour FOXP1 (B) mais négatives pour le CD10 (C) correspondant à un sous-type non GCB soit un sous-type ABC (D'après van den Brand et al. 2016)

Les ABC-DLBCL ont donc des caractéristiques cellulaires propres à ce sous-type de DLBCL et nous allons voir qu'il existe également des mutations spécifiques.

III.2 Mutations oncogéniques

Les ABC-DLBCL vont exhiber un ensemble de mutations conduisant à ce phénotype tumoral activé (*pour revue Frick, M., Dörken, B., & Lenz, G. 2011*).

Tout d'abord, les ABC-DLBCL expriment XBP-1, régulateur majeur du phénotype sécrétoire des cellules plasmiques (*Shaffer, A et al. 2004 ; Wright, G et al. 2003*). En revanche, c'est la combinaison de plusieurs évènements mutationnels qui va bloquer la différenciation finale en cellules plasmiques. Un quart des patients ABC-DLBCL possèdent des mutations inactivatrices du gène *PRDM1* codant BLIMP1 (*Pasqualucci, L et al. 2006; Tam, W et al. 2006*). Lors du chapitre consacré au développement B, nous avons mentionné que BLIMP1 assure la différenciation en plasmocyte en terminant le programme d'expression de la cellule B mature (*Shaffer, A et al. 2002*). Récemment, de nouvelles études ont montré que la surexpression de certains micro ARNs comme let-7 pouvait être considéré comme une alternative au mécanisme de dérégulation de BLIMP1 (*Nie, K et al. 2010*). En outre, la différenciation plasmocytaire est également bloquée par des translocations affectant le répresseur de *PRDM1*, *BCL6*, et ce phénomène va se retrouver détecté dans près de 25% des cas de patients ABC-DLBCL (*Iqbal, J et al.2007 ; Tunyaplin, C et al. 2004 ; Shaffer, A et al. 2000*). Enfin, 26% des cas vont exhiber un gain/amplification et une activation constitutive des facteurs de transcription de la famille des ETS comme SPIB qui est capable de réprimer l'expression de BLIMP1 (*Lenz, G. et al. 2008 ; Schmidlin, H et al.2008*).

Dans l'ensemble, l'inactivation de *PRDM1* par différents mécanismes démontre bien que le blocage de la différenciation plasmocytaire est une caractéristique propre du sous-type ABC-DLBCL.

Mais il ne faut pas oublier de mentionner les autres anomalies génétiques pouvant être retrouvées dans de DLBCL. Ainsi, les ABC-DLBCL sont également caractérisés par des délétions au niveau du locus du suppresseur de tumeur *INKa/ARF* et cela dans environ 30% des cas (*Lenz, G et al. 2008 ; Tagawa, H et al.2005*). Une autre caractéristique ABC mentionnée de manière récurrente est le gain/ amplification de la région 18q qui permet de surexprimer la protéine anti-apoptotique *BCL2* (*Lenz, G et al. 2008; Bea, S. et al. 2005*). A noter que la trisomie 3 est souvent détectée dans le cas précis du sous-type ABC-DLBCL mais pas dans les autres types de DLBCL (*Lenz, G et al. 2008 ; Bea, S. et al. 2005*). Par ailleurs *FOXP1* pourrait constituer un gène cible clé de la trisomie 3. En dehors du sous-type ABC, *FOXP1* a également été décrit comme oncogénique dans le MALT notamment via des phénomènes de translocations (*Lenz, G et al. 2008 ; Haralambieva, E et al. 2006 ; Streubel, B et al. 2005*).

Comme mentionné dans le chapitre 1 et 2, la voie NF- κ B est primordiale pour assurer une bonne réponse immunitaire et un bon développement de la cellule B. Or, cette voie de signalisation peut également être activée de façon constitutive dans un contexte pathologique et en particulier dans les DLBCL. C'est le cas pour le sous-type ABC pour lequel l'activité aberrante de NF- κ B va promouvoir la prolifération et inhiber l'apoptose (*Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., & Staudt, L. M. 2001*). L'usage d'inhibiteurs de NF- κ B, comme un inhibiteur d'IKK, est toxique pour des lignées cellulaires du sous-type ABC mais pas celles appartenant au sous-type GCB-DLBCL. NF- κ B joue donc un rôle prépondérant dans la

lymphomagenèse du sous-type ABC-DLBCL (*Lam, L. T et al. 2005 ; Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., & Staudt, L. M. 2001*). Par ailleurs, certains shRNA (small hairpin RNA) dirigés contre CARD11, BCL10, et MALT1 dans des lignées de cellules ABC-DLBCL conduisent aussi à leur apoptose (*Ngo V.N et al. 2006*). Le complexe CBM en aval du BCR est activé de façon constitutive dans les ABC-DLBCL, environ 10% des patients ont des mutations sur CARD11 responsables de cette activité aberrante de NF- κ B (*Lenz, G et al. 2008*). Les ABC-DLBCL possédant un CARD11 intact vont avoir besoin d'une activation chronique du BCR c'est pourquoi 20% des cas ABC exhibent des mutations sur le CD79B et parfois le CD79A. Ces mutations affectent les motifs ITAM entraînant une activation réduite de LYN qui est normalement un régulateur négatif de la transduction du signal via le BCR, ces altérations renforcent l'expression du BCR à la surface de la cellule et garantissent ainsi un signal BCR chronique. Cela sous-entend que l'activation chronique du BCR est un évènement oncogénique majeur dans la biologie des ABC-DLBCL possédant un CARD11 non muté (*Davis, R. E. et al. 2010*).

D'autres mécanismes oncogéniques additionnels peuvent activer de façon constitutive la voie NF- κ B. Ainsi un tiers des patients ABC-DLBCL vont avoir une inactivation bi allélique du régulateur négatif de NF- κ B, A20 (*Compagno, M et al. 2009 ; Kato, M et al. 2009*). La possibilité de réintroduction de A20 dans les lignées cellulaires déficientes montrent de nouveau une inhibition de la transduction du signal NF- κ B et induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (*Compagno, M et al. 2009*). Une autre étude a montré que des mutations de type gain de fonction ciblant la protéine adaptatrice MYD88, responsable de la médiation des récepteurs TLR et de l'IL1R, résultent là encore en une activation constitutive de NF- κ B (*Ngo, V et al. 2011*).

La Figure 64, récapitule ainsi l'ensemble des mutations retrouvées dans le sous-type ABC-DLBCL.

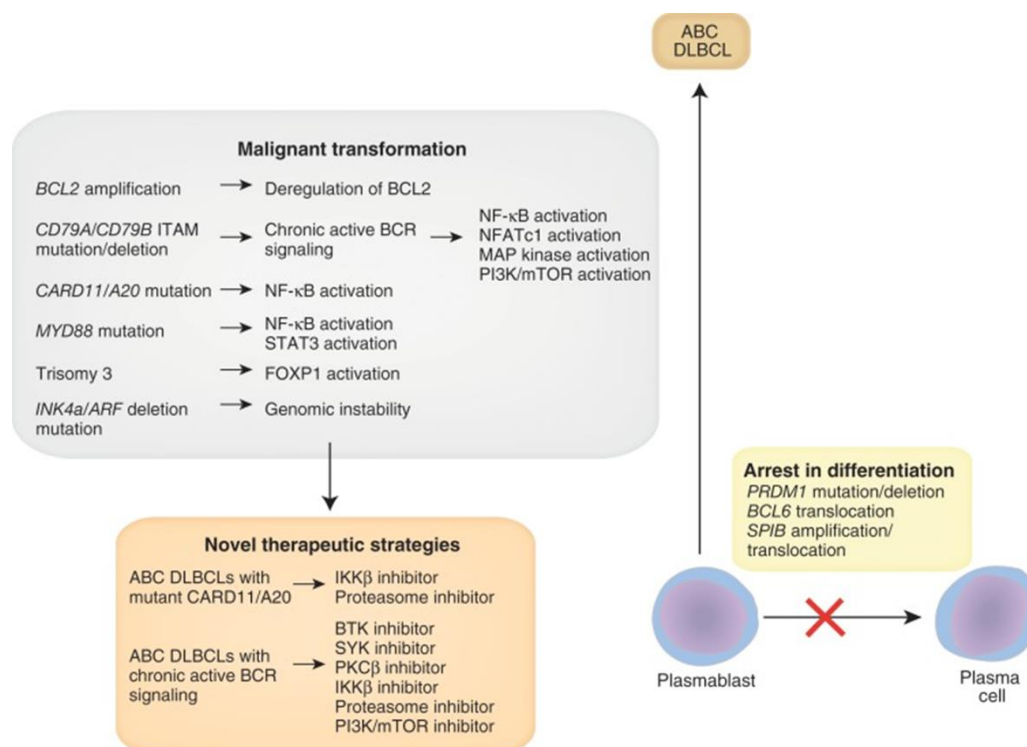


Figure 64.. **Principaux évènements oncogéniques retrouvés dans le sous-type ABC-DLBCL**

Le sous-type ABC-DLBCL dérive de plasmablastes caractérisés par un blocage du processus de différenciation. Les ABC-DLBCL ont une activation constitutive de NF-κB et des dérégulations de la protéine anti apoptotique *BCL2*. Ainsi, les mécanismes moléculaires responsables de l'activation aberrante de NF-κB vont déterminer la capacité des cellules à répondre à des inhibiteurs spécifiques. (D'après Frick, M., Dörken, B., & Lenz, G. 2011).

III.3 Traitement

Comme tout DLBCL, les ABC-DLBCL vont être traités par une approche R-CHOP cependant dû aux phénomènes de rechutes et résistances certaines thérapies ciblées peuvent être envisagées. Elles viennent ainsi en complément de la première intention de traitement au R-CHOP. Parmi elles, nous pouvons citer les inhibiteurs d'IKKβ pour les ABC-DLBCL avec des mutations sur *CARD11* et *A20*. En revanche pour les ABC-DLBCL non atteints de ces mutations mais avec une activation chronique du BCR, on privilégiera les inhibiteurs de BTK, SYK, PKCβ, IKKβ mais aussi les inhibiteurs du protéasome et de la voie PI3K/mTOR (Figure 65).

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la lymphomagenèse est donc crucial pour proposer la prise en charge thérapeutique la plus adaptée et la plus ciblée. Nous allons donc voir que cette problématique est la même pour le second grand sous-type de DLBCL, le GCB-DLBCL. Comparé aux ABC-DLBCL, le GCB-DLBCL va exhiber des mutations propres sur *EZH2*, *TNRSF14* ou encore *Myc* et ce tout en partageant également des mutations communes avec le sous-type ABC comme la mutation *BCL6* ou *CREBBP* (Figure 65).

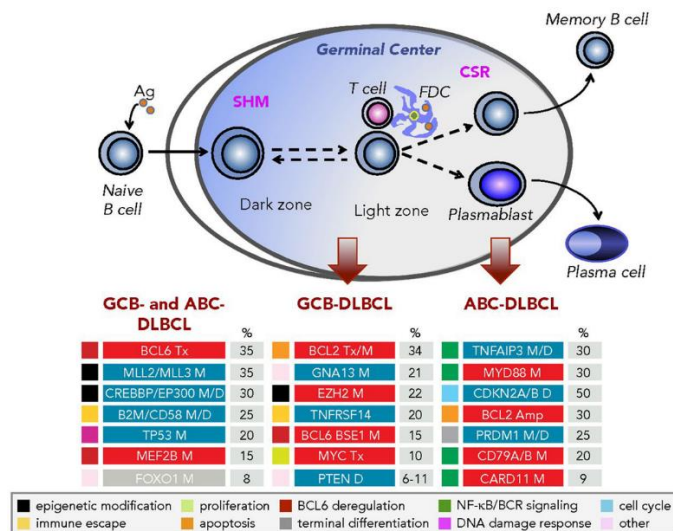


Figure 65. Origine cellulaire et lésions génétiques associées à chaque sous-types distincts de DLBCL

Représentation schématique des réactions du GC ainsi que ses liens avec les 2 sous-types moléculaires de DLBCL NOS : GCB-DLBCL et ABC-DLBCL. Les DLBCL non classifiés ne sont pas montrés sur cette figure. Les mutations, altérations génétiques les plus fréquentes identifiées (dont celles communes aux 2 sous-type de DLBCL et celles propres à chaque sous-type) sont mentionnées dans la fenêtre du bas. La couleur bleue indique une perte de fonction et le rouge un gain de fonction, le code couleur (à gauche) fait la distinction entre plusieurs catégories en prenant en compte la voie de signalisation cellulaire associée. Les abréviations suivantes sont mentionnées sur cette figure : Ag, antigène; Amp, amplifications; D, deletions; FDC, follicular dendritic cells; M, mutations; Tx, chromosomal translocations. A noter que pour des fréquences plus faibles, les mutations pouvant affecter CARD11, TNFAIP3 et MYD88 autre que le point clé L265P peuvent être observées dans des cas de GCB-DLBCL. Les mutations CREBBP peuvent être retrouvées dans tous les sous-types, cependant leurs fréquences dans les GCB-DLBCL est de 30% versus 15% chez les ABC-DLBCL. Schéma adapté et avec permission de Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. 2015. (D'après Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. 2018).

Autre fait distinctif et intrigant, les ABC-DLBCL et les GCB-DLBCL ne répondent pas de la même façon à la thérapie R-CHOP. De nombreuses études démontrent ainsi que le GCB-DLBCL a un pronostic beaucoup plus favorable comparé aux ABC-DLBCL (Figure 64). Ainsi, la survie globale des patients à 5 ans est de 76% pour le sous-type GCB-DLBCL contre 16% pour les patients ABC-DLBCL (Alizadeh, A. A et al. 2000). Ce phénomène fait alors l'objet de recherches approfondies dans le but de mieux comprendre les processus de lymphomagenèse B dans les cas de DLBCL. Nous allons donc poursuivre ce chapitre 3 par une dernière partie consacrée aux GCB-DLBCL.

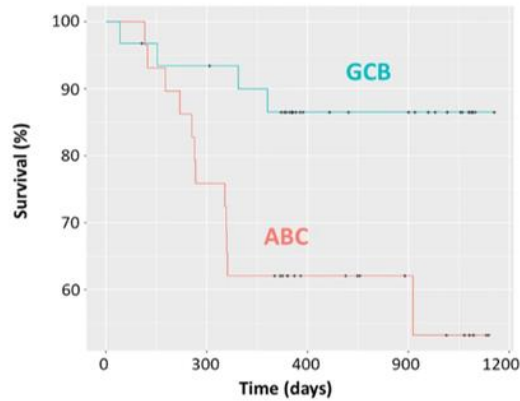


Figure 66. Courbe de survie ABC vs GCB généré à partir des données de la cohorte EpiSwitch DLBCL-CCS et Fluigdim

Courbe de Kaplan-Meier (progression sans rechute, free progression survival) des échantillons ABC (ligne rouge) et GCB (ligne bleue) générée pour la cohorte DLBCL-CCS (Chromosome conformation Signature). Les échantillons de type ABC démontre une plus faible survie à long terme comparés aux échantillons GCB (D'après Hunter, E et al. 2020).

IV. GCB-DLBCL

Le GCB-DLBCL, comme son nom l'indique, est le second grand sous-type de lymphome B-NHL DLBCL qui survient lors des stades de différenciations propres à l'environnement du GC. Par conséquent, la chronologie veut que les GCB-DLBCL surviennent à des stades plus précoces du développement B et avec un phénotype cellulaire moins activé qu'une tumeur de type ABC-DLBCL.

IV.1 Généralités

Le GCB-DLBCL est causé par la prolifération anormale et non contrôlée d'une cellule B du GC. Comme pour les ABC-DLBCL, les symptômes seront les mêmes que ceux mentionnés précédemment. Au niveau de la morphologie cellulaire, il est possible de distinguer par marquages en immunohistochimie des tissus de tumeurs GCB d'un tissu ABC (Figure 62).

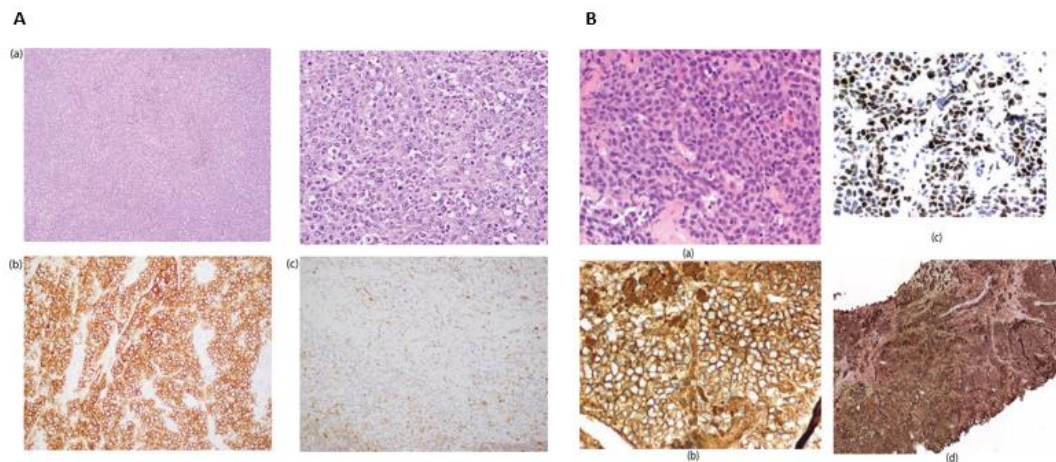


Figure 67. Coupes de ganglions lymphatiques de tissus GCB-DLBCL (A) et ABC-DLBCL (B) et marquages immuno-histochemiques associés

La section (A) à gauche représente une coupe de ganglions lymphatiques de type GCB-DLBCL. (a) Colorations H&E de ganglions lymphatiques soulignant l'infiltration diffuse de cellules larges en taille avec des contours nucléaires irréguliers, une chromatine vésiculaire et certains noyaux de grandes tailles (x10 et x20 en focus). (b) Marquage IHC au CD20 montrant que les cellules infiltrées (x20) sont bien CD20 positives. (c) Les cellules GCB-DLBCL sont en majorité négatives pour MUM1 (x20). (B) La section à droite montre une coupe de tissus de ganglions lymphatiques ABC-DLBCL. (a) En coloration H&E, une infiltration de larges cellules est là aussi visible avec des contours nucléaires irréguliers et une chromatine vésiculaire (x40). (b) En marquage IHC, les cellules sont CD20 fortement CD20 positives (x20). (c) A l'inverse des GCB-DLBCL, les ABC-DLBCL sont positives pour MUM1 (x20) et positive pour le CD79A (x20). (D'après Kumar, V et al. 2018).

Ainsi, on retrouve via l'analyse IHC des tissus, les marqueurs distinctifs d'un tissu GCB-DLBCL qui est MUM1 négatif et CD20 positif.

De la même façon, certaines voies oncogéniques vont être propres au sous-type GCB-DLBCL (pour revue Shimkus, G., & Nonaka, T. 2023).

IV.2 Voies oncogéniques

Les cellules issues de GCB-DLBCL sont généralement atteintes sur les fonctions régulatrices de BCL6 comme retrouvées chez le sous-type ABC. En revanche, les GCB possèdent des mutations uniques dont la l'amplification de *REL* (en lien avec NF- κ B), que nous avons déjà évoquée pour la promotion de la lymphomagenèse.

c-Rel NF κ B dans le GCB-DLBCL faisant l'objet de ma thèse, il est important de rappeler certaines implications de cette sous-unité en contexte pathologique.

Pour commencer, c-Rel est capable chez l'Homme de transformer des splénocytes de poulet de façon maligne et cette transformation est accélérée par la co expression de BCL2. (Gilmore, T. D et al. 2001).

La surexpression de c-Rel peut également promouvoir les capacités invasives et migratoires des cellules dans un contexte de choriocarcinome (Sekiya, Y et al.2017).

c-Rel dicte également le seuil inflammatoire en agissant comme un facteur transcriptionnel répressif (de Jesús, T. J., & Ramakrishnan, P. 2020)

Concernant le cycle cellulaire, la « down » régulation transitoire de c-Rel conduit à une augmentation de l'apoptose, l'inhibition de la prolifération et induit un délai G2/M là aussi dans un modèle de lignée cellulaire de choriocarcinome (Lorenz, V. N., Schön, M. P., & Seitz, C. S. 2014).

De plus, c-Rel peut avoir comme partenaire cible BACH2. Il a été montré qu'un « knock out » c-Rel *in vivo* entraînait une diminution des protéines membres de la famille NF- κ B, des gènes associés au cycle cellulaire et du gène BACH2 (*B-cell tumour suppressor BTB and CNC homology 2*) (Hunter, J. E. et al. 2016).

Enfin les variants d'épissage de REL comme le REL Δ 9 déjà mentionné dans le chapitre 1, a été retrouvé dans 6 tumeurs DLBCL comparées aux B normaux. Il possède une meilleure capacité à activer la transcription dans une étude par gène rapporteur utilisant la luciférase dans des cellules A293 (Leeman, J. R., Weniger, M. A., Barth, T. F., & Gilmore, T. D. 2008).

En plus de ses fonctions pathologiques dans divers processus de pathogenèse, c-REL possède un rôle singulier dans les DLBCL. Comme mentionné plus haut, on retrouve bien une signature NF- κ B dans les ABC-DLBCL mais le sous-type GCB est lui aussi intimement lié à cette voie de signalisation. En effet, le site REL 2p16 est fréquemment décrit dans la littérature comme un site régulier d'amplification pour les cellules B. Par conséquent, cette même région REL 2p16 est retrouvée amplifiée dans 15 à 20% des GCB-DLBCL (Gilmore and Gerondakis, 2011 ; Gilmore and Courtois 2006 ; Li et al.2015).

Cette amplification de la région REL 2p16 semble donc rattacher c-Rel au sous-type GCB-DLBCL. La littérature montre que dans les échantillons comportant une amplification REL 2p16, la localisation nucléaire c-Rel est augmentée (Houldsworth, J et al.2004 ; Barth et al. 2003). De façon surprenante, la localisation nucléaire de c-Rel a été corrélée à un mauvais pronostic de survie à la fois pour les ABC-DLBCL et les GCB-DLBCL (Curry, C. V et al. 2009). Dans cette étude, l'expression de c-Rel est détectée par des marquages immunohistochimiques, et les auteurs corrèlent cette positivité à l'expression de BCL-6, CD10, et MUM1/IRF4. Une localisation nucléaire de c-Rel est retrouvée dans 65% des cas ABC-DLBCL (Figure 68).

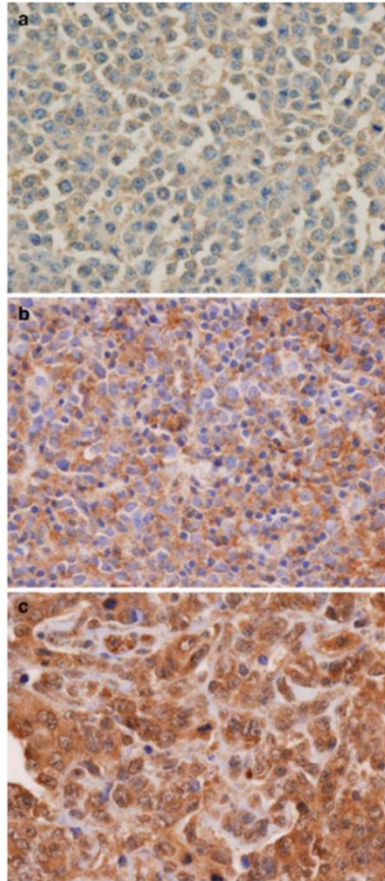


Figure 68. Représentation des coupes de tissus de patients atteints de DLBCL pour le marquage anti-c-Rel

(x400) (a) et (b) coupes négatives pour l'expression de c-Rel: expression nucléaire négative de c-Rel ou faible (a) à modérée (b) pour l'expression cytoplasmique. (c) Cas de coupe fortement positive au c-Rel exhibant un marquage à la fois nucléaire et cytoplasmique de c-Rel. (D'après Curry et al.2009)

Enfin, il est important de mentionner que la littérature peut se contredire au sujet d'un lien entre amplification de REL et amplification des niveaux protéiques de c-Rel (*Gilmore & Courtois 2006 ; Houldsworth, J et al.2004*).

Dans les GCB-DLBCL, nous pouvons également citer la translocation t(14 ;18)(q32;q21) qui va aller activer et surexprimer BCL2. De même, il peut y avoir des mutations de CREBBP affectant son domaine histone acétyltransférase entraînant un ensemble de dérégulation au niveau épigénétique (*Iqbal, J. et al. 2004 ; Kusumoto, S. et al.2005 ; Kridel et al. 2012 ; Visco, C. et al. 2013 ; Miao, Yet al.2019*). Cependant, l'incidence de ces mutations chez tous les patients GCB-DLBCL est plutôt faible et ne permettent pas nécessairement de faire la distinction propre avec d'autres pathologies.

L'un des problèmes majeurs de la stratification des DLBCL repose sur la disparité des réponses aux traitements en présence de mutations similaires à la fois dans les ABC et les GCB comme la mutation TP53 ou encore MYC (*Jia, Z et al. 2012 ; Xu-Monette Z.Y et al.2012 ; Xu-Monette, Z. Y et al.2016 ; Cao, Y et al.2016*). Cette observation couplée au large éventail

de mutations retrouvées dans les DLBCL (Figure 65) suggère qu'il faut désormais regrouper les mutations communes pouvant être retrouvées dans les ABC et les GCB et surtout les cibler de façon précise (Mansouri, L et al.2022).

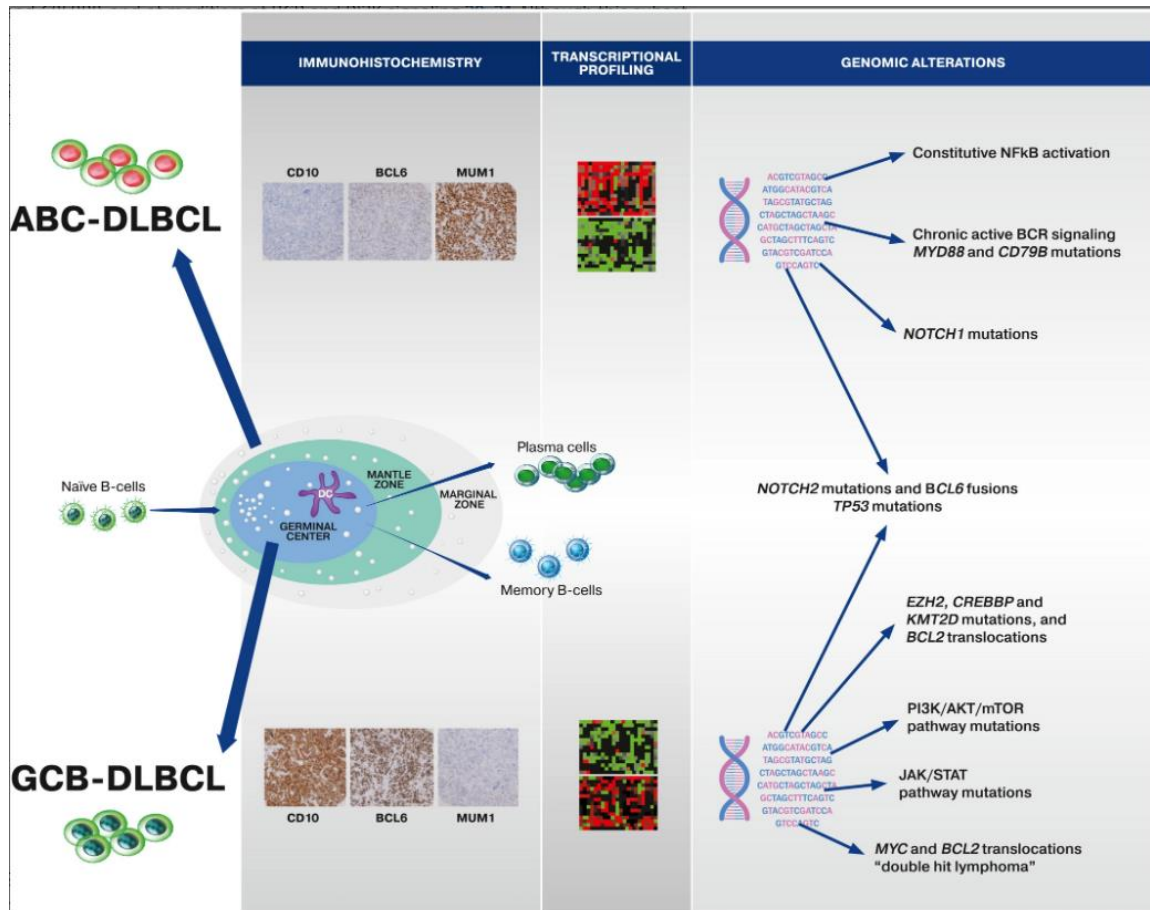


Figure 69. Représentation schématique des DLBCL selon la cellule d'origine, la caractérisation par immunohistochimie, le profil d'expression génique et les analyses moléculaires.

ABC correspond aux activated B-cell-like subtype; GCB, germinal center B-cell-like subtype. (D'après Abramson, J. S. 2019)

IV.3 Traitement

Comme dit précédemment, le traitement des DLBCL passe par la recherche de mutations clés propres à un sous-type ou bien au 2 dans le but d'une stratégie thérapeutique ciblée. Ainsi, on va pouvoir cibler différentes voies de signalisation retrouvées fréquemment mutées (Table 3) dans le sous type GCB (pour revue Abramson, J. S. 2019). Il est ainsi possible de cibler la signalisation du BCR, de PI3K/AKT/mTOR, la voie NF-κB, la voie BC2, certaines voies de régulation épigénétique comme EZH2, la signalisation MYC dépendante et enfin les grands axes de régulation responsables de l'échappement immunitaire comme PD1/PDL1 (Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. 2014 ; Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. 2023 ; Wang, L., Li, L. R., & Young, K. H. 2020).

Molecular target	DLBCL subtype specificity	Inhibitor	Status in DLBCL therapy
BCL2 family	DLBCL	(a) ABT-737 [Oltersdorf <i>et al.</i> 2005]	Preclinical and clinical
		(b) ABT-263 [Wilson <i>et al.</i> 2010]	
BCL6	DLBCL	(a) 79-6 [Cerchielli <i>et al.</i> 2010]	Preclinical
		(b) PU-H71 [Cerchielli <i>et al.</i> 2009]	
BTK	ABC DLBCL with wildtype CARD11	(a) Dasatinib [Davis <i>et al.</i> 2010]	(a) Preclinical
		(b) PCI-32765 [Davis <i>et al.</i> 2010]	(b) Preclinical and clinical
IKK	ABC DLBCL, PMBL	PS-1145 and MLX105 [Lam <i>et al.</i> 2005]	Preclinical
JAK	ABC DLBCL, PMBL	(a) Small-molecule pan-JAK inhibitor [Lam <i>et al.</i> 2008]	Preclinical
		(b) TG101348 (JAK 2-inhibitor) [Rui <i>et al.</i> 2010]	
MALT1	ABC DLBCL	zVRPR-fmk [Ferch <i>et al.</i> 2009; Hallfinger <i>et al.</i> 2009]	Preclinical
PI3K	DLBCL	(a) LY294002 [Klopp <i>et al.</i> 2011; Uddin <i>et al.</i> 2006]	Preclinical
		(b) BKM120	
PKC	ABC DLBCL with CD79A/B mutations	Sotrastaurin [Naylor <i>et al.</i> 2011]	Preclinical
Proteasome	DLBCL	Bortezomib [Dunleavy <i>et al.</i> 2009]	Clinical
SYK	ABC DLBCL with wildtype CARD11	R406 [Friedberg <i>et al.</i> 2010]	Preclinical and clinical

DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; ABC, activated B-cell-like; GCB, germinal-center B-cell-like; IKK, I κ Ba kinase; PMBL, primary mediastinal B-cell lymphoma.

Table 3. Inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation cellulaires responsables de la lymphomagenèse des DLBCLs (D'après Frick, M., Dörken, B., & Lenz, G. 2011).

Tableau récapitulatif des agents moléculaires, type de DLBCL, inhibiteur et statut de développement préclinique ou cliniques des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisations cellulaires impliquées dans la lymphomagenèse des DLBCL.

Il y a donc un besoin rapide en options thérapeutiques non cytotoxiques pour les patients atteints de DLBCL. Il existe de nouveaux agents récemment approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) comme le Polatuzumab avec la Bendamustine plus Rituximab, le Selinexor ou le Tafasitamab plus Lenalidomide. Le polatuzumab cible CD79b et est combiné à la Bendamustine, un agent alkylant connue pour ses effets cytotoxiques (Lalic, H *et al.* 2022). Le Rituximab se fixe aux cellules CD20, le Selinexor est un inhibiteur sélectif de l'exportine (XP01) responsable de l'export nucléaire (Mo, C. C *et al.* 2023). D'après l'EMA, le Tafasitamab est un anticorps spécifique du CD19 tandis que la Lénalidomide réalise un blocage du développement des cellules anormales, empêche la croissance des vaisseaux sanguins dans les tumeurs tout en stimulant les cellules du système immunitaire afin de les aider à éliminer les cellules anormales.

De plus, l'utilisation de CAR-T cell est également autorisé par la FDA dans d'autres essais cliniques. De nombreux autres agents sont encore en développement dont des anticorps bispécifiques et des anticorps conjugués. La prise en charge thérapeutique des DLBCL s'envisage alors par une approche de combinaisons de thérapies ciblées qui devraient progressivement montrer une amélioration des traitements et une meilleure survie des patients (pour revue Cheson, B. D., Nowakowski, G., & Salles, G. 2021).

Cependant, avant même d'envisager une molécule thérapeutique, il faut produire un gros effort de recherche fondamentale pré-clinique pour trouver les cibles à viser et mieux décortiquer l'ensemble des processus de lymphomagenèse B notamment par l'étude sur modèles murins pré-clinique du DLBCL en général et en particulier du GCB-DLBCL (pour revue Meyer, S. N., Koul, S., & Pasqualucci, L. 2021). Nous allons donc aborder dans le chapitre suivant quels modèles d'études du GCB-DLBCL, au cœur de ce projet de thèse, nous disposons dans la littérature et en quoi c-Rel pourrait constituer une cible thérapeutique clé dans cette pathologie.

Chapitre 4 Modèles d'étude de la lymphomagenèse B dépendants de NF- κ B et cas de la sous-unité c-Rel dans le GCB-DLBCL

Dans le chapitre 1, nous avons rappelé le contexte particulier de la réponse immune B ainsi que la signalisation cellulaire au travers de la cellule B et notamment l'impact de la voie NF- κ B. Au cours du chapitre 2, le développement spécifique de ce lymphocyte B a été abordé ainsi que ces différents stades de maturation et leurs liens avec la voie NF- κ B. Enfin, le chapitre 3 a exposé les cas de développements B anormaux et en particulier les B-NHL avec une dérégulation de NF- κ B au travers des ABC-DLBCL et des GCB-DLBCL. Nous allons voir dans ce dernier chapitre 4 les modèles *in vitro* et *in vivo* d'étude de NF- κ B dans le contexte du DLBCL.

IV.1 Modèles *in vitro*

Il existe dans la littérature plusieurs lignées cellulaires afin d'étudier les DLBCL. De façon générale, il existe de nombreuses lignées de B-NHL commercialisées pour des études *in vitro* comme SUDHL1,2,5,8,10 et 16 mais également des NUDUL1. Par exemple, Lyu et al. (Lyu, M. A., Cao, Y. J., Mohamedali, K. A., & Rosenblum, M. G. 2012) utilise pour ses études *in vitro* du DLBCL, deux lignées ABC-DLBCL, OCILY3 et OCILY10 qui expriment des hauts niveaux de BAFF-R, BCMA et de TACI. Concernant les GCB-DLBCL, les lignées étudiées sont OCILY1, OCILY4 et OCILY19 mais aussi SUDHL4 et SUDHL6. Par conséquent, les lignées de DLBCL vont constituer un premier outil majeur d'étude *in vitro* (pour revue Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. 2022). L'établissement de ces lignées selon le sous-type ABC et GCB s'appuie alors sur les différentes classifications vues dans le chapitre 3, notamment l'étude de Alizadeh (Alizadeh et al. 2000).

La première lignée cellulaire de leucémie/lymphome dérivée de patient a été établie en 1964 par Pulvertaft (Pulvertaft, R. J. V. 1964). Depuis, de nombreuses autres lignées ont pu être générées et caractérisées selon un processus similaire illustré sur la Figure 70.

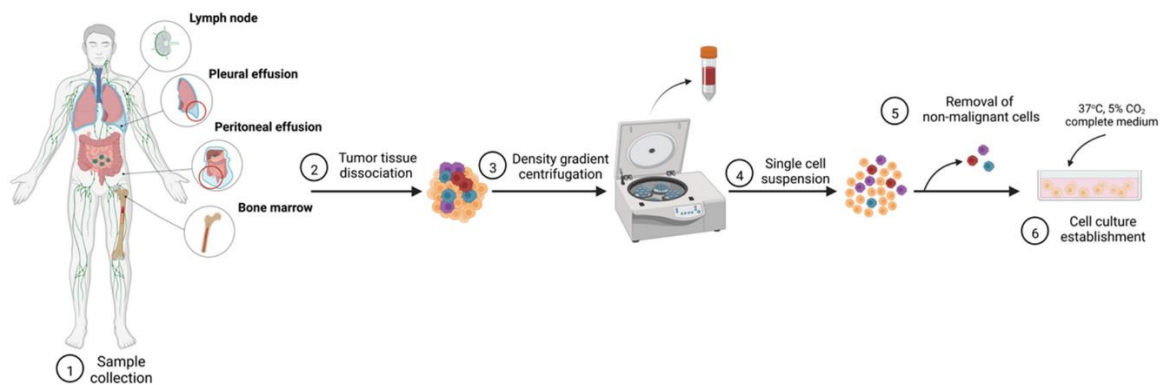


Figure 70. Isolation et génération d'une lignée cellulaire dérivée de cellules de patient (créée avec Biorender d'après Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. 2022)

Représentation schématique des étapes successives permettant l'obtention de lignées cellulaires pour l'étude *in vitro* des pathologies humaines.

Dans le cas particulier des DLBCL, la difficulté est de reproduire la très grande hétérogénéité de ce type de tumeur avec les sous-types associés (Quentmeier, H et al.2019). A l'origine de l'établissement de nombreuses lignées de DLBCL se trouvent deux centres de recherches américains : SU (Stanford University) et OCI (Ontario Cancer Institute) (Epstein, A. L., & Kaplan, H. S. 1978 ; Tweeddale, M. et al 1989 ; Chang, H. O. N. G. et al. 1992). C'est Epstein et al. qui vont établir 3 lignées SUDHL (négatives pour le virus d'Epstein-Barr, EBV) à partir d'un épanchement pleural pour SUDHL1 et 2 ou d'un épanchement péritonéal pour SUDHL3. Elles seront suivies par 7 autres lignées : SUDHL7, 8, 9, 10 (épanchement pleural) et SUDHL4 et 6 (épanchement péritonéal) et enfin à partir de ganglions lymphatiques pour la lignée SUDHL5. Toutes ces lignées vont donc représenter de nombreux cas de DLBCL (Epstein, A. L., & Kaplan, H. S. 1978). Concernant les lignées OCILY1, 2, 3, 4, 7, 8 et 18, elles ont été caractérisées d'un point de vue phénotypique et histologique, et sont aussi EBV négatives (Tweeddale, M. et al 1989 ; Chang, H. O. N. G. et al. 1992). A noter que ces lignées peuvent être établies au diagnostic (OCILY4, 8 et 18) ou bien durant une phase de rechute (OCILY1, 2, 3, 7).

Pour le sous-type ABC-DLBCL, les lignées représentatives fréquemment mentionnées dans la littérature sont les Ri-1 (Riva), SUDHL2, 9, OCILY18, HBL1, RC-K8, U2946 ou encore les TDM8. En fonction des caractéristiques propres de chaque lignée, elles vont constituer un modèle de choix pour l'étude préclinique d'une ou des dérégulations associées au sous-type ABC. Par exemple, la lignée U2946 possède une surexpression de MCL1 muté (membre de la famille de BCL2) qui favorise la résistance aux traitements et la survie des cellules cancéreuses (Quentmeier, H et al.2019).

Concernant les GCB-DLBCL leur phénotype est plutôt CD10+, BCL6+ (Nowakowski, G. S., & Czuczman, M. S. 2015). Comme indiqué dans le chapitre 3, les GCB-DLBCL ont un meilleur pronostic de survie comparé aux ABC-DLBCL cependant leur très grande hétérogénéité complique la prise en charge ciblée de ces patients au cas par cas (Nowakowski, G. S., & Czuczman, M. S. 2015 ; Susanibar-Adaniya, S., & Barta, S. K. 2021 ; Bujisic, B et al. 2017). Parmi les modèles de lignées propres au sous-type GCB-DLBCL, on retrouve RL, SUDHL4, 6, 8, 10, OCILY1, 3,7 et Karpas422. Les lignées SUDHL4 et SUDHL6 possèdent de hauts niveaux d'expression de REL et BACH2. En revanche SUDHL4 est mutée sur le gène TP53

alors que SUDHL6 est mutée sur le gène EZH2. De plus, la lignée Karpas422 possède à la fois la translocation t(14;18) (oncogène BCL2) plus une translocation t(4;11) (qui produit l'oncogène de fusion AF4/MLL) représentant ainsi un modèle d'étude intéressant car résistant aux approches chimiothérapeutiques classiques (Dyer, M. J et al. 1990). Pour rappel, l'une des marques distinctives du sous-type GCB-DLBCL (30% des cas) est la translocation t(14;18) qui va induire une surexpression de BCL2 (Bakhshi, T. J., & Georgel, P. T. 2020 ; Barrans, S. L et al 2003). Cette translocation est corrélée de manière significative à un mauvais pronostic comparé aux GCB-DLBCL n'arborant pas cette translocation, respectivement 29% à 63% de survie. Les lignées GCB-DLBCL possédant justement cette translocation sont les SUDHL4, SUDHL6 et les OCILY1.

Il est donc possible de générer un large éventail de lignées cellulaires à partir des tumeurs de patients (Table 4) afin de mieux comprendre le comportement et le dysfonctionnement des cellules tumorales de DLBCL.

Cell Line	Citation	Age, Sex	Cell Source and Clinical Stage	EBV-Status	Immunophenotype	Characteristic Mutations, Aberrations or Translocations	Culture Requirements
ABC-DLBCL cell line models							
HBL-1	Abe et al. [56]	65 y.o. male	Pleural effusion	Negative	(IgM, K), Bf, BA-I+, and HLA-DR'	t(14;18)	RPMI-1640 No glutamine Doubling time: 48 h
HBL-2	Abe et al. [56]	84 y.o. male	Cervical lymph node biopsy	Negative	Monoclonal surface Igs (IgM, D, A), Fcγ-receptors, C3 receptors, Bf, and HLA-DR'. Weak positivity for IgD	t(11; 14)(q13,q32)	RPMI-1640 Glutamine Doubling time: 48 h
ULA	Berglund et al. [57]	57 y.o. male	Ascites IV stage	Negative	CD10+, CD19+, CD20+, CD22+, CD27+, CD38+, CD40+, CD79b+, IgM+, IgD+, lambda light chain+, FMC7+, BCL-2+, BCL-6+, MHC class I and II+	p53-gene loss (14;18)(q32;q21)	Opti-MEM (45%) IMDM (45%) Glutamine Could not survive in RPMI-1640 Doubling time: N/A
TDM8	Tohda et al. [58]	62 y.o. male	Bone marrow	Negative	CD5+, CD19+, CD20+, HLA-DR+, s-IgM, s-kappa	48, XY, add(1)(p37), add(1)(q42), add(8)(p27), del(8)(q7), +8, i(9)(p10) x 2, 15p, +18, -19, +mar karyotype	α-MEM No glutamine Doubling time: 30 h
OCI-Ly18	Chang et al. [32]	56 y.o. male	Pleural effusion, High grade DLBCL	Negative	CD19+, CD20+, CD21+, CD23+, CD34+	Translocations involving bands • 8q24 • 14q32 • 18q21	IMDM No glutamine Doubling time: 36 h
RC-K8	Kubonishi et al. [59]	55 y.o. male	Peritoneal effusion	Negative	Complement receptors+, Ia+, B1+, and Leu 12 antigens+	14q+ chromosome, EBNA-t(11;14)(q23;q32)	RPMI-1640 No glutamine Doubling time: 48–60 h
U-2946	Quentmeier et al. [36]	52 y.o. male	Pleural effusion, IV stage DLBCL	Negative	CD20+, CD79a+, CD10+, BCL-6+, MYC+, p53+ Partial expression of MUM1 and FOXP1	t(8;14)	RPMI-1640 Glutamine Doubling time: 48 h
GCB-DLBCL cell line models							
Karpas422	Dyer et al. [38]	72 y.o. female	Pleural effusion	Negative	CD19+, CD37+, IgM+, and IgG+, 30% of cells IgD+ Weak CD10+ Stable expression of CAMPATH-1 (CDw52) as in normal lymphocytes	t(14;18) t(4;11)	RPMI-1640 No glutamine Doubling time: 60–60 h
MYC, BCL-2/BCL-6 rearrangement models							
EJ-1	Goy et al. [60]	43 y.o. female	Ascites, IV stage DLBCL	Negative	CD10+, CD19+, CD20+, CD22+, CD45+, CD79b, sigM, and light chain lambda+	t(14;8) t(8;14) del(7)(q31q32)	RPMI-1640 Glutamine Doubling time: 24 h
RC	Pham et al. [61]	Unknown	Pleural effusion, High-grade DLBCL	Negative	CD10+, CD19+, CD20+ (a small subset), CD22+, CD23+, CD38+, CD43+, CD44 (only partially), CD45+, CD79b+	t(2;8)(p12;q24.2) t(14;18)(q32;q21.3)	RPMI-1640 No glutamine Optimally could be split 1:2 every 3–4 days.
U-2973	Boström et al. [62]	42 y.o. male	Peripheral blood mononucleated cells at diagnosis	Negative	CD19+, CD20+, CD22+, CD10+, CD38+, cytoplasmic CD79a, and dim kappa surface Ig. FMC7+ (only partially), CD52+ CMYC+, and BCL2+	t(14;18)(q32;q)	RPMI-1640 No glutamine Doubling time: 34 h

Table 4. Lignées cellulaires utilisées comme modèles d'étude des DLBCL (d'après Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. 2022)

Le tableau représente le type de lignée cellulaire, l'âge du patient dont elles sont dérivées, le statut EBV positif ou négatif, l'immunophénotype, les mutations caractéristiques, les anomalies génétiques ainsi que les translocations et enfin les conditions de culture spécifiques de ces lignées.

Bien que les lignées de DLBCL constituent un outil de travail performant et rapide, elles ne prennent pas en compte le contexte cellulaire complexe dans lequel se trouve une tumeur qui va recevoir de nombreux signaux de nature variée. C'est pourquoi l'établissement de modèles murins préclinique *in vivo* est indispensable pour aller plus loin dans l'analyse et se rapprocher de ce qui peut se passer dans un organisme entier.

IV.2 Modèles *in vivo*

Dans cette partie, nous allons voir que de nombreux modèles de souris permettent d'étudier la lymphomagenèse B et plus particulièrement les deux sous-types de DLBCL d'intérêt les ABC et les GCB. L'expérimentation animale sur la souris est connue depuis les années 1930 car c'est une espèce abondante (*Rosenthal, N., & Brown, S. 2007*). La souris (*Mus musculus*) est ainsi considérée comme un modèle de choix pour l'étude des pathologies humaines et les justifications vis-à-vis de ce choix sont nombreuses. Parmi elles, la similarité génétique entre l'Homme et la souris, leur petite taille, ainsi que la durée de vie. Notons que 99% des gènes humains ont leurs gènes homologues chez la souris (*La Perle, K. M., & Couto, S. S. 2010 ; Waterston, R. H et al. 2002*). Nous partageons également de nombreuses caractéristiques physiologiques avec les souris notamment au niveau de la disposition et du fonctionnement des organes comme le système cardiovasculaire, endocrine et immunitaire.

Dans le cas précis de l'hématopoïèse, les leucocytes circulants prédominants sont les lymphocytes B alors que chez l'Homme ce sont les neutrophiles (*Treuting, P. M., Dintzis, S., & Montine, K. S. (Eds.). 2017; La Perle, K. M., & Couto, S. S. 2010; Percy, D. H., & Barthold, S. W. 2013*). Quelques différences sont à noter concernant l'hématopoïèse extra-médullaire dans la pulpe rouge de la rate qui est physiologique chez la souris adulte et qui ne doit donc pas être interprétée comme une néoplasie (*La Perle, K. M., & Couto, S. S. 2010*). On dénombre également un nombre important de précurseurs hématopoïétiques chez la souris, comparé à l'Homme. De plus, du tissu thymique ectopique peut être retrouvé dans différents endroits de la région cervicale mais ne constituent pas des néoplasies (*Treuting, P. M., Dintzis, S., & Montine, K. S. (Eds.). 2017*).

La revue de Kohnken, Porcu & Mishra expose différents modèles murins (*Kohnken, R., Porcu, P., & Mishra, A. 2017*). L'amélioration des techniques de génomique a permis le développement de modèles murins translationnels et fidèles aux pathologies hématopoïétiques malignes retrouvées chez l'Homme. La classification des modèles murins de pathologies hématologiques néoplasiques inclut des modèles spontanés, des xénogreffes et des organismes génétiquement modifiés (Table 5).

Model	Advantages	Disadvantages
Spontaneous	No/minimal manipulation needed Whole-organism system available to study disease pathogenesis	May not be accurate/translational to human disease condition Typically arises in older animals—time consuming and more costly
Xenograft (cell line-derived)	Relative simplicity High yield Rapid results Relatively inexpensive Multiple routes of administration Avoid immune rejection with immunocompromised strains (commercially available) Useful as first step investigation Useful as confirmatory for <i>in vitro</i> findings	Lack of organ/system microenvironment (except for orthotopic) Lack of immune system interaction with tumor cells Relative inability to test complex genomic interactions in a single-cell system Cell lines likely differ significantly from parental source (tumor)
Xenograft (patient-derived)	Relative simplicity High yield Rapid results Multiple routes of administration Avoid immune rejection with immunocompromised strains (commercially available) Useful as first step investigation More true representation of tumor cell biology than above Useful for investigation into efficacy of therapeutics on human tumor cells	Lack of organ/system microenvironment (except for orthotopic) Lack of immune system interaction with tumor cells Relative inability to test complex genomic interactions in a single-cell system
Humanized mice	Competent immune system to model tumor-immune interaction Can engraft cell lines, human tumor tissue, or genetically manipulated cells More true representation of tumor cell biology in a human-like system Useful for investigation of tumor pathobiology	Expensive Time consuming Generally need to establish breeding colony
Germline transgenic	Faithful alteration of gene of interest Immunocompetent mice Useful for testing tumor development Useful for testing therapeutic approaches Useful for testing chemopreventative techniques	Transgene is universally expressed in every tissue Transgene is expressed throughout embryologic development Genetically not as complex as many human tumors
Conditional transgenic	Faithful alteration of gene of interest Immunocompetent mice Targeted tissue-specific expression Targeted temporal expression Useful for testing tumor development Useful for testing therapeutic approaches Useful for testing chemopreventative techniques	Challenging technique Expensive Many mice will not carry desired genotype following crossing Genetically not as complex as many human tumors
Multi-allelic transgenics (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9)	Multiple genes can be manipulated to more closely mimic disease complexity Ability to test cooperating mutations	Challenging technique Expensive Potential of off-target mutations

Table 5. Type de modèle murin, avantages et désavantages (d'après Kohnken, R., Porcu, P., & Mishra, A 2017)

Le tableau présente le type de modèle murin, ses avantages ainsi que ses inconvénients.

Dans le cadre du projet de thèse, nous avons fait le choix de modèles murins génétiquement modifiés. Dans la littérature, le terme GEMM pour « Genetically Engineered Mouse Model » est employé. Les GEEM sont utilisés pour mimer et reproduire les cancers humains chez la souris avec une étiologie basée sur les aberrations génétiques fréquemment retrouvées. Pour produire un GEEM, il faut donc amener une mutation dans un gène d'intérêt (Figure 71).

L'obtention de GEMM peut se faire par microinjection d'un transgène dans le pronucléus mâle d'un ovule fécondé. Par conséquent, la descendance arborera des copies additionnelles de ce gène. Dans cette approche de transgénèse additionnelle, le gène d'intérêt peut également être modifié pour que l'expression soit rendue spécifique d'un tissu (utilisation de promoteur tissus spécifique) ou en réponse à l'administration d'un traitement (par exemple utilisation d'un promoteur Tet inducible par la doxycycline) (Rosenthal, N., & Brown, S. 2007). Notons que l'apport du transgène peut aussi se faire par l'utilisation d'un vecteur viral pour infecter un embryon au stade multicellulaire. Ces deux premières approches présentent plusieurs limites dont les deux principales sont liées au site d'intégration pouvant modifier significativement les gènes à proximité et à l'insertion en tandem conduisant à une expression anormalement importante potentiellement toxique pour les cellules.

La technique la plus utilisée pour générer des GEMM consiste en l'utilisation des cellules ES (embryonic stem cell). L'avantage majeur de cette approche tiens au fait qu'il est possible de réaliser une transgénèse ciblée par recombinaison homologue. On peut ainsi générer des « Knock-In » (KI) pour apporter des mutations oncogéniques dans un oncogène ou un gène

suppresseur de tumeur. Une approche par « Knock-out » (KO) peut aussi être d'intérêt pour invalider un gène suppresseur de tumeur.

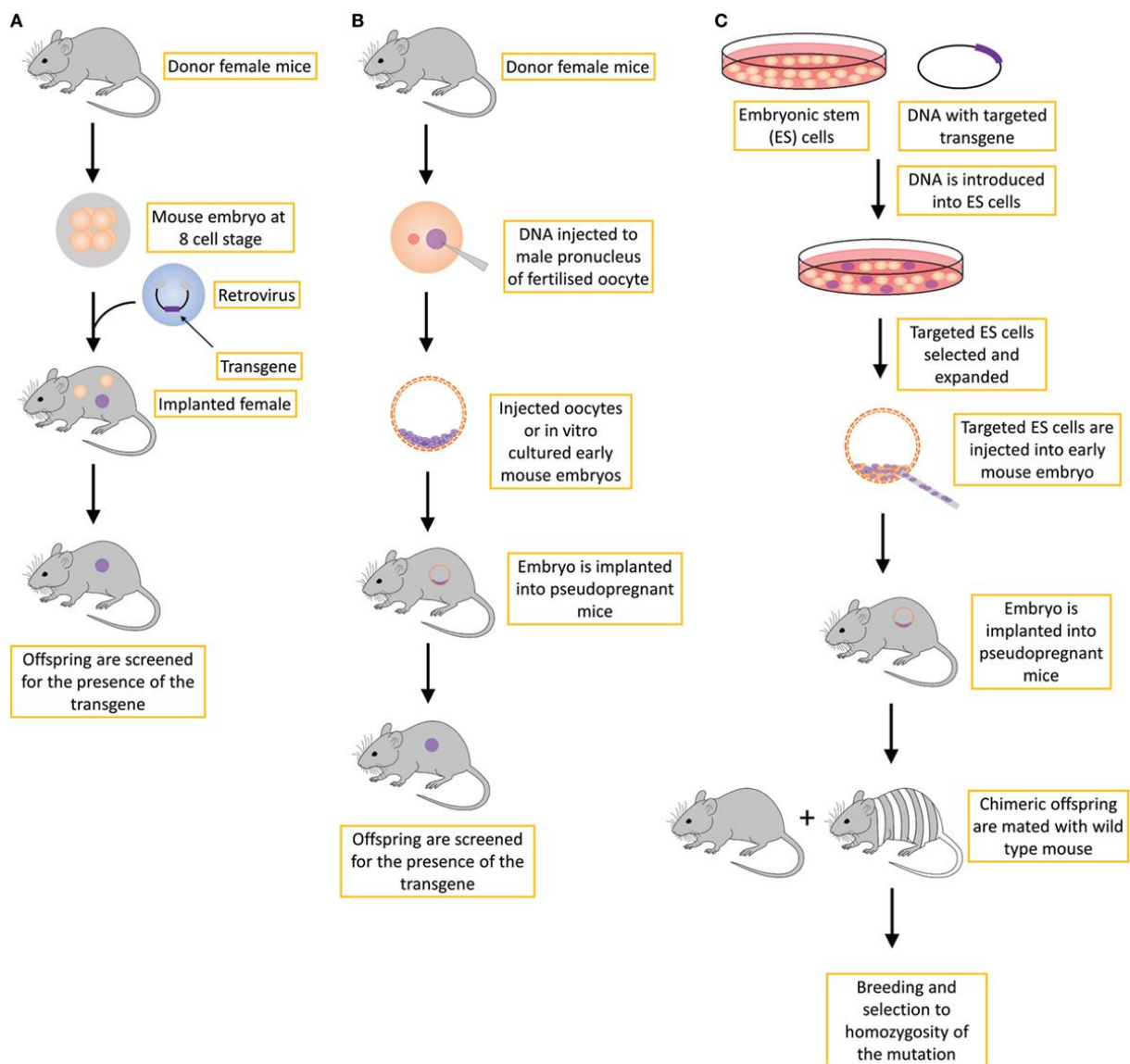


Figure 71. Stratégies d'établissement de modèles murins transgéniques

Méthodes scientifiques pour la création de modèles murins transgéniques incluant : (A) une approche rétrovirale, qui n'est plus utilisée en routine, (B) méthodologie standard utilisant un transgène, l'ADN est inséré dans le génome de façon non spécifique et (C) approche par gène ciblé qui est utilisée en routine pour créer des modèles murins de knock out conventionnels, généralement associé avec une mutation entraînant une perte de fonction constitutive. (Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018).

L'un des défis majeurs de la manipulation de cellules ES est la présence de mutations pouvant survenir lors du développement embryonnaire qui pourraient altérer de façon aberrante des cibles non désirées et éloigner ainsi le phénotype du modèle murin de la pathologie humaine

à mimer. Afin d'éviter ce type de problème, les modèles murins de KI ou KO conditionnels sont développés par croisements de souris possédant une ADN recombinase (Cre ou FLP Flippase sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique) avec des souris portant le gène d'intérêt génétiquement modifié (système Cre-LoxP et FLP-FRT). Par conséquent, il est alors possible de monitorer de façon précise le KI ou le KO dans le temps et l'espace (*Rosenthal, N., & Brown, S. 2007*).

Les lignées germinales de GEMM permettent ainsi la recherche de mécanismes pouvant être impliqués dans la transformation oncogénique mais également l'évaluation de l'efficacité de certains agents thérapeutiques sur la tumeur dans un microenvironnement intact (*Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. 2010 ; Sharpless, N. E., & DePinho, R. A. 2006*). De même, certaines GEMM peuvent être rendues inductibles dans le cas de KI, pour activer des mutations dans des tissus spécifiques en réponse à une drogue ou à un traitement par transduction avec un vecteur viral (*Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. 2010 ; Cook, G. J., & Pardee, T. S. 2013*). Nous verrons notamment l'illustration de ce système lors de la description de notre modèle murin qui utilise la souris AID-Cre^{ert2}-Tomato.

Malgré la performance de ces GEMM, ces modèles ne sont pas capables de reproduire de façon fidèle la complexité des tumeurs humaines (*Richmond, A., & Su, Y. 2008*). C'est pourquoi le développement de modèles murins utilisant la technique CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) représente un outil puissant afin d'étudier le cancer. Dans ce cas, le système CRISPR/Cas9 peut-être directement délivré dans le zygote de la souris (ou également via l'utilisation de lignées ES) pour générer un animal possédant des modifications génétiques extrêmement ciblées et précises (*Qin, W et al. 2016*).

Il existe alors des modèles propres à un large éventail de pathologies humaines comme pour les lymphomes B qui nous intéressent ici. Comme mentionné dans les chapitres précédents, les DLBCL représentent un des cas les plus communs de lymphomes B avec les FL, les MZL et les BL (*Donnou, S et al. 2012*). Prenons pour exemple, la translocation de l'oncogène *MYC* sous le contrôle d'un promoteur B spécifique fort qui conduit en l'apparition d'un lymphome B de type Burkitt. En ce sens, citons le modèle murin transgénique E μ -*MYC* capable de reproduire l'insertion de *MYC* au locus IgH avec une incidence du lymphome dans 100% des cas (*Donnou, S et al. 2012*). Ce modèle va alors mimer le développement d'une forme immature de BL et une forme plus indolente mais plus mature de DLBCL (*Mori, S et al. 2008*). Le processus de lymphomagenèse peut ensuite être accéléré dans ce modèle par l'introduction d'un rétrovirus murins exprimant l'oncogène *Ras* (*Greenwald, R. J et al. 2004*).

De la même manière, il existe des modèles de FL mimant la translocation t(14 ;18) qui va activer l'expression de *BCL2* en se liant au locus IgH. L'utilisation des séquences régulatrices du gène *Vav* conduisent à l'expression de *BCL2* chez la souris produisant ainsi un FL (*Egle, A. et al. 2004*). En outre, ce modèle a été utile dans l'étude du rôle prolongé de la réactivité du centre germinatif et de l'hypermutation des gènes V. La délétion au stade embryonnaire de AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase) chez la souris va prévenir les FL liés à *BCL6*, expliquant la place importante de AID dans la génération d'altérations génétiques additionnelles dans la pathogenèse (*Pasqualucci, L. et al. 2008*). La kinase SYK (Spleen tyrosine kinase) est requise pour la survie des tumeurs dans le modèle E μ -*MYC*/BCR/sHEL. Par conséquent, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de SYK cause alors une régression de la tumeur *in vivo* (*Young, R. M et al. 2009*). C'est par le biais de ce type d'étude que la galectine-1, protéine carbohydrate avec diverses fonctions immunes, a été identifiée comme un déterminant important de la réponse aux anticorps thérapeutiques (*Lykken, J. M et al. 2016*).

Concernant les souris « humanisées » infectées à l'EBV, elles sont capables de développer des pathologies B lymphoprolifératives ainsi que des lymphohistiocytoses hémophagocytiques associées à l'EBV. Là aussi, l'utilisation de ces modèles a permis d'élucider le rôle de la réponse innée et en particulier la réponse adaptative des LT spécifiques à l'EBV dans ces pathologies (Fujiwara, S., Imadome, K. I., & Takei, M. 2015). Les HL associés à l'EBV vont se développer chez la souris dans un contexte de microenvironnement T activé alors que les B-NHL se développent dans un environnement affaibli en T en réponse à une infection à l'EBV (Lee, E. K et al. 2015). Il est également possible de développer des mutants de l'EBV afin de générer des formes plus agressives de lymphoproliférations chez la souris et mieux comprendre le rôle de certains gènes viraux dans la pathogenèse (Fujiwara, S., Imadome, K. I., & Takei, M. 2015).

Les modèles murins de lymphomes (Table 6) sont donc nombreux, variés et constituent un outil majeur de compréhension de la pathologie humaine dans le but de développer les thérapies les plus efficaces.

Disease	Gene targets	Model	Translation	Therapeutic use
B-cell lymphoma	MYC	Conditional transgenic using Ig heavy chain	B-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma	
	MYC + RAS	Conditional transgenic with retrovirus transduction	Accelerated development of B-cell lymphoma	CD20 immunotherapy
	SYK	MYC/BCR/sHEL transgenic	B-cell lymphoma	SYK inhibitors
Follicular lymphoma (FL)	BCL-2	Transgenic linked to Vav regulatory sequence	FL	
EBV-induced disease		Humanized mice infected with EBV	B-cell lymphoproliferative disease, hemophagocytic lymphohistiocytosis	
Peripheral T-cell lymphoma (PTCL)	ITK-SYK	Inducible transgenic using CD4-Cre	Disseminated PTCL	SYK inhibitors
Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)	NPM-ALK	Inducible transgenic using CD4-Cre	ALCL	
Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)	IL-15	Transgenic	CTCL	HDAC inhibitors

Table 6. Exemples de modèles murins de lymphomes (d'après Kohnken, R., Porcu, P., & Mishra, A. 2017)

Le tableau représente certains exemples de modèles murins pré-clinique de lymphome, les gènes cibles qui vont être dérégulés, les conséquences pathologiques de ces dérégulations et l'usage de traitements thérapeutiques sur ces modèles.

IV.2.1 Cas des ABC-DLBCL

Des modèles murins spécifiques aux DLBCL ont ainsi pu être développés afin de mimer ce type de B-NHL.

L'utilisation de la technique CRISPR/Cas9 a pu révolutionner la construction de modèles murins notamment par la sélection spécifique de mutations retrouvées dans les signatures GCB ou ABC. De plus, les modèles de DLBCL génétiquement modifiés par des mutations directes dans les lignées humaines ou par le biais de combinaisons chez la souris en fonction de son fond génétique a permis d'étudier les coopérations de ces altérations génétiques (Caeser, R et al. 2019 ; Felce, S. L. et al. 2020). Comme FOXP1 capable d'éteindre la voie de

signalisation du BCR ou éteindre la coexpression de BCL2/MYC ou BCL2/BCL6 et l'expression de gènes relatifs aux GCB ou aux ABC-DLBCL (Reddy, A. *et al.* 2017; Greiner, V *et al.* 2019 ; Schlager, S *et al.* 2020).

La revue de Yanguas-Casás, Pedrosa, Fernández-Miranda, & Sánchez-Beato (Yanguas-Casás, N., Pedrosa, L., Fernández-Miranda, I., & Sánchez-Beato, M. 2021) propose une liste de modèles de DLBCL dont certains sont propres aux ABC-DLBCL.

Citons une première construction de modèle murin ABC-DLBCL ciblant l'axe BCL6 établi en 2005. Comme vu précédemment, des altérations génétiques dérégulant l'expression de BCL6, répresseur transcriptionnel requis pour la formation des GC, sont fréquemment retrouvées dans les DLBCL. La construction du modèle murin de Cattoretti *et al.* (Cattoretti, G *et al.* 2005) est représentée en Figure 72.

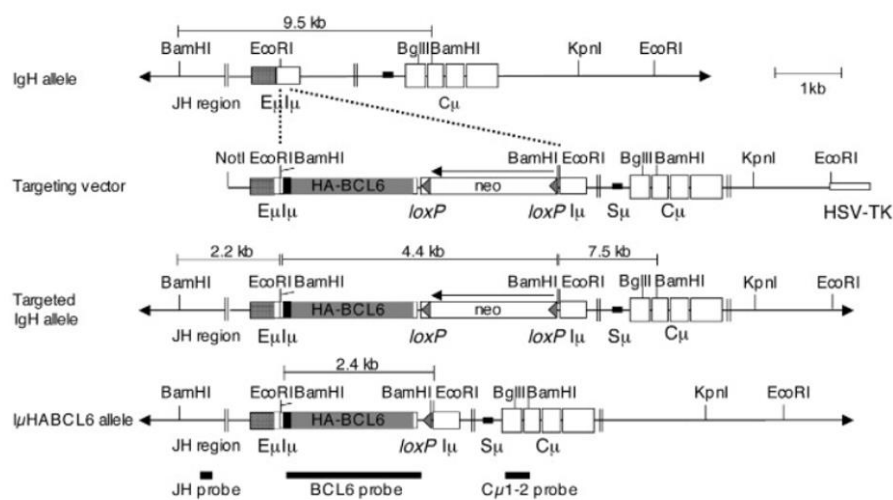


Figure 72. Génération du KI BCL6 dans le modèle IμHABCL6

*Stratégie de ciblage : Le locus IgH murin est illustrée en haut du schéma et au milieu est représenté le processus de recombinaison homologue avec le vecteur de ciblage contenant un cDNA de BCL6 murin en aval et un tag hémagglutinine plus une cassette de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur fort PGK flanké de 2 sites LoxP. Le gène de la thymidine kinase (HSV-TK) sert ici de marqueur de sélection positive des cellules transfectées. La configuration finale de l'allèle recombiné après l'excision de la cassette néo médiée par la Cre recombinase in vitro est montrée au bas du schéma. Les fragments de restrictions attendus et les sondes utilisées pour le Southern Blot sont également mentionnés sur le schéma. Les abréviations suivantes correspondent : Eμ, immunoglobulin heavy chain intronic enhancer; Iμ, immunoglobulin mu sterile transcript promoter; Cμ, the four Cμ exons; Sμ, switch mu region (D'après Cattoretti, G *et al.* 2005)*

Ces souris vont favoriser la formation de GC et perturber la différenciation post-GC normale avec une diminution du nombre de plasmocytes commutés. Ces souris développent un syndrome lymphoprolifératif exhibant des caractéristiques similaires aux DLBCL et plus précisément au sous-type ABC. Ce modèle a donc permis de mettre en lumière le rôle oncogénique de BCL6 dans la pathogenèse du DLBCL.

Un autre modèle de DLBCL se rapprochant du sous-type ABC est le modèle murin MYD88 L252P (Figure 73) de Knittel (*Knittel, G et al. 2016*). Nous avons exposé dans les chapitres précédents le rôle crucial de MYD88 dans l'activation des TLR puis de la voie NF- κ B. C'est pourquoi les mutations MYD88 et en particulier la mutation L265P ont été décrites en grand nombre dans plusieurs pathologies malignes B dont les DLBCL chez l'Homme. De plus, 29% des ABC-DLBCL possédant une activation constitutive de NF- κ B ont la mutation L265P. De la même façon, l'autre aberration génétique fréquemment retrouvée dans les ABC-DLBCL est le gain de copies BCL2. Dans cette étude, les auteurs ont donc généré un nouveau modèle de souris utilisant la Cre recombinase dans les cellules B conduisant à une expression conditionnelle de MYD88 L252P (la mutation orthologue de la mutation humaine MYD88 L265P) à partir du locus endogène. Ainsi, ces souris développent des pathologies lymphoprolifératives pouvant mener à des lymphoproliférations clonales. Dans ce cas, la pathologie développée a les caractéristiques immuno-phénotypiques des ABC-DLBCL. Le processus de lymphomagenèse peut être accéléré par un croisement avec un nouvel allèle médiant cette fois-ci la surexpression conditionnelle de BCL2. Les expériences menées *in silico* (à partir de lignées de patients), montrent que les ABC-DLBCL ayant la mutation MYD88 sont addictes à BCL2. C'est pourquoi ce nouveau modèle murin pré-clinique d'ABC-DLBCL peut constituer un outil performant pour le développement et la validation pré-clinique de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement des ABC-DLBCL.

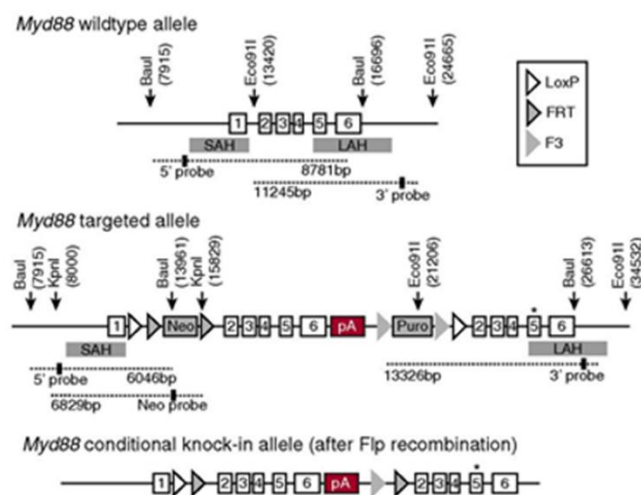


Figure 73. Construction de l'allèle conditionnel Myd88p.L252P

Le ciblage du locus MYD88 se fait dans les cellules souches embryonnaires de souris C57BL/6N Tac. Le locus endogène MYD88 est ciblé par le vecteur linéarisé décrit dans les data supplémentaires. L'allèle cible de départ est situé au milieu du schéma et ce même allèle après la recombinaison (Flp-médiée) de FRT et des dites F3 est situé en bas du schéma. Les sondes utilisées pour le southern blot : Baul, Eco91I, et KpnI dont l'ADN génomique a été digéré avec des sondes 5' et 3' et la sonde Néo sont représentées sous le schéma de la stratégie de ciblage. La position des sites de restrictions et des sondes sont mentionnées au-dessus du schéma. (D'après Knittel, G et al. 2016)

Ce modèle MYD88/BCL2 a permis de tester une nouvelle combinaison thérapeutique Venetoclax et anti-PDL1 qui augmente la survie des animaux suggérant ainsi que cette

stratégie thérapeutique pourrait constituer une option performante de traitement pour les ABC-DLBCL avec mutations MYD88 et gains de copies BCL2 (Flümann, R et al. 2021).

Vous trouverez en Table 7, une liste non-exhaustive de modèles murins d'ABC-DLBCL (pour revue Yanguas-Casás et al.2021).

	Strategy	Phenotype/Incidence	Prospective Uses
Genetically engineered mice	E μ -Myc	DLBCL (time dependent) [99]	
	E μ -BRD2	DLBCL [91]	
	Bcl6 Knock in	GC-DLBCL [92]	
	Bcl6/Myc	ABC-DLBCL [92]	
	I μ :HA.BCL6	36–62% lymphoma incidence [92]	Combination with conditional <i>Spn</i> and <i>Tnfrsf3</i> knockout or oncogenic <i>Notch2</i> alleles to model Cluster BN2
	<i>Mb1:Cre;Eμ:Bcl2;Crebbp^{fl/fl}</i>	GC-DLBCL [103]	
	<i>Cγ1^{Cre/lox};Kmt2d^{fl/fl};VavP.Bcl2</i>	21% incidence GC-DLBCL [104]	Combination of the different alleles to generate a sophisticated EZB mouse model
	<i>Ezh2^{cond.p.Y641F/wt};VavP.Bcl2;Cγ1^{Cre/wt}</i>	DLBCL-like lymphoma [105]	
Syngeneic models	<i>Cd19^{Cre/wt};Myd88^{cond.p.L252P/wt};Rosa26^{LSL.BCL2-IRE5-GFP/wt}</i>	85% incidence ABC-DLBCL [106]	Modeling of the MCD cluster by combination of both alleles and a newly generated <i>CD79B^{cond.p.Y1984I/wt}</i> allele, or with the already existing <i>Prdm1^{fl/fl}</i>
	<i>Cγ1^{Cre};Prdm1^{fl/fl};Rosa26^{LSL.IKK2a}</i>	50% incidence IRF4, post-GC DLBCL [107]	
	Pi-BCL1 (m) iv or ip in BALB/c immunocompetent mice	DLBCL [108,109]	Gene editing Generation of complex organoids prior to inoculation of the cell line
Xenograft models	A20 (m) iv, intrasplenic, or sc injection in BALB/c immunocompetent mice	DLBCL [110–112]	
	SU-DHL-4 (h) iv or sc in SCID immunodeficient mice	DLBCL [113,114]	Gene editing Generation of organoids Inoculation in humanized NOD/SCID mice
	Transduced HPCs in irradiated mice	GC- and ABC-DLBCL [103,115]	Generation of a-la-carte HPCs reproducing the genetic signatures Inoculation in humanized NOD/SCID mice
	PDX iv or sc in immunodeficient mice	20–30% successful engraftment	Use of humanized mice to study lymphoma physiology and drug responses Personalized medicine
	PDO iv or sc in immunodeficient mice	20–30% successful engraftment	Genetic modification Use of humanized mice to study lymphoma physiology and drug responses Personalized medicine.

The headings of each mouse model subtype are highlighted in bold.

Table 7. Liste récapitulative des modèles murins de DLBCL couramment utilisés.

Le tableau propose une liste de modèles murins précliniques les plus couramment utilisés mimant les pathologies de type DLBCL. Abbreviations: DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma; GC: germinal center B-cell like; ABC: activated B-cell like; (m): murine origin; (h): human origin; iv: intravenous; ip: intraperitoneal; sc: subcutaneous; PDX: patient derived xenograft; PDO: patient derived organoid. (D'après Yanguas-Casás et al.2021)

Nous allons voir maintenant les modèles murins disponibles dans la littérature pour étudier le second sous-type de B-NHL les GCB-DLBCL. A noter que la frontière entre les modèles murins ABC et GCB reste parfois floue et qu'il peut être compliqué de distinguer à l'avance si les mutations ciblées vont induire des ABC ou des GCB-DLBCL. C'est pourquoi, pour une mutation donnée, certains modèles d'ABC et de GCB peuvent se chevaucher.

IV.2.2 Cas des GCB-DLBCL

Comme vu dans le paragraphe précédent, l'établissement d'un modèle murin préclinique va reposer sur des stratégies de ciblage de mutations différentes. Dans le cadre des GCB-DLBCL, la stratégie de ciblage mutationnelle sera donc différente.

En 2021, la revue de Meyer, Koul & Pasqualucci (Meyer, S. N., Koul, S., & Pasqualucci, L. 2021) fait état de nombreuses stratégies d'établissement de modèles murins transgéniques pour modéliser le GCB-DLBCL. Pour rappel, le FL est une forme indolente de lymphome B mais représente tout de même un challenge thérapeutique car il demeure incurable. Cependant, une partie des patients vont voir leur FL se transformer vers une forme plus agressive de lymphome de type GCB-DLBCL et dans ce cas un pronostic de survie beaucoup

moins favorable (Casulo, C., Burack, W. R., & Friedberg, J. W. 2015 ; Lossos, I. S., & Gascoyne, R. D. 2011). Comme mentionné précédemment les mutations clés se situent sur la protéine anti-apoptotique BCL2 causée par la translocation t(14 ;18) sous le contrôle du promoteur fort IgH (Kridel, R., Sehn, L. H., & Gascoyne, R. D. 2012). De plus, certains évènements oncogéniques additionnels peuvent être requis pour donner lieu à une transformation maligne du lymphome comme les mutations somatiques des régulateurs d'histones par exemples ou affectant la chromatine comme la méthyltransférase KMT2D (mutée dans 70-80% des cas), CREBBP acétyltransférase (65% des cas) ; la méthyltransférase EZH2 (22% des cas) et de manière plus rare les mutations de ARID1A (Li, H et al. 2014 ; Morin, R. D et al. 2010 ; Morin, R. D et al. 2011 ; Okosun, J et al. 2014 ; Pasqualucci, L et al. 2011). A partir de l'identification de ces mutations spécifiques, des modèles murins ont donc été développés pour mimer les mutations de type gain de fonction sur MEF2B (15% des cas) (Ying, C. Y et al. 2013) ; des pertes de fonctions bi alléliques et délétions de TNFRSF14/HVEM (jusqu'à 40% des cas) (Okosun, J et al. 2014 ; Ying C Y et al. 2013) et des points de mutations sur le gène RRAGC. Par conséquent les modèles murins arborant ce type de mutations vont développer à la fois des FL et des GCB-DLBCL.

Le premier exemple de GEMM que je choisis de commenter est celui mimant la perte de fonction de CREBBP, une histone acétyltransférase indispensable pour la régulation de la réaction du GC au niveau transcriptionnel avec un effet opposé à celui de BCL6 (García-Ramírez, I et al. 2017). Les mutations inactivatrices de CREBBP sont retrouvées à la fois dans le FL et dans les GCB-DLBCL. L'étude de Garcia-Ramirez et al. indique que différents modèles murins transgéniques (Figure 73) avec perte de CREBBP conduisent à une expansion des LB du GC (en renforçant l'effet répresseur de BCL6) et montrent une coopération avec une surexpression de BCL2 afin de promouvoir le développement d'un lymphome B du GC. Par ailleurs, l'article démontre la clonalité des tumeurs développées et leur origine du GC (Figure 73). Le profilage transcriptionnel et épigénétique montre que cette inactivation CREBBP est associée à une variété d'altérations transcriptionnelles. Ainsi, les cellules B possédant l'inactivation CREBBP ont également de hauts niveaux d'expression de c-Myc et des motifs d'acétylations altérés, localisés sur les motifs de liaisons à l'ADN de c-Myc. L'étude souligne ainsi le lien entre l'inactivation de CREBBP et la dépendance à BCL2 mais également le rôle de cette inactivation dans l'induction d'une surexpression de MYC et de ses gènes cibles.









Strain		Floxed Crebbp	mb1-Cre	EμBcl2	B cell Phenotype
<i>Cbp^{WT/F}</i>		-/+	-/-	-/-	No Effect
<i>Cbp^{F/F}</i>		+/+	-/-	-/-	No Effect
<i>EμBcl2</i>		-/-	-/-	-/+	<i>Bcl2</i> over-expression
<i>Cbp^{F/F} x EμBcl2</i>		+/+	-/-	-/+	<i>Bcl2</i> over-expression
<i>Cbp^{WT/Δ}</i>		-/+	-/+	-/-	One allele <i>Crebbp</i> deletion
<i>Cbp^{Δ/Δ}</i>		+/+	-/+	-/-	Two allele <i>Crebbp</i> deletion
<i>Cbp^{WT/Δ} x EμBcl2</i>		-/+	-/+	-/+	One allele <i>Crebbp</i> deletion & <i>Bcl2</i> over-expression
<i>Cbp^{Δ/Δ} x EμBcl2</i>		+/+	-/+	-/+	Two allele <i>Crebbp</i> deletion & <i>Bcl2</i> over-expression

Figure 74. Modèles murins de délétion CREBBP

Le nom de chaque modèle murin produit dans cette étude est exposé et la stratégie d'inactivation de CREBBP ou de surexpression de BCL2 est indiqué. (D'après García-Ramírez, I et al. 2017).

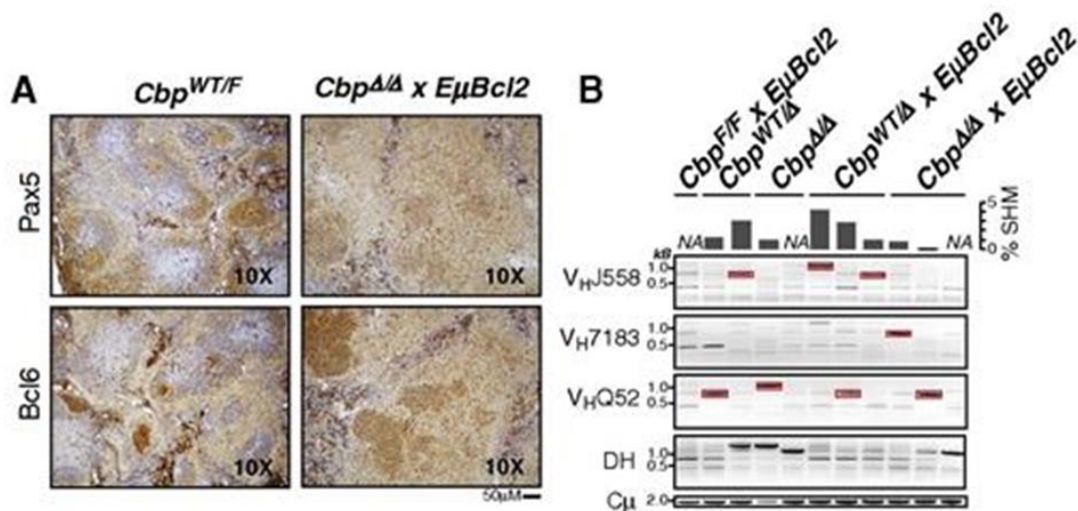


Figure 75. Les lymphomes développés par les souris transgéniques CREBBP ont pour origine une cellule du GC

(A) Exemple d'une coloration IHC pour la rate d'une souris contrôle (*Cbp*^{WT/F}) avec une souris de même âge ayant développé un lymphome à *Cbp*^{Δ/Δ}x*EμBcl2*. La souris contrôle montre une disposition normale et bénigne de ces follicules et un motif de coloration Pax5 et BCL6 classique. En revanche, la souris atteinte de lymphome dans la rate montre une histologie diffuse avec des cellules Pax5⁺ et BCL6⁺ en lien avec une origine cellulaire GCB. (B) Etude des réarrangements VDJ par PCR sur des ADN extraits de tumeurs de rate et de rate contrôle (*Cbp*^{F/F}x*EμBcl2*). La souris contrôle possède une distribution de ces bandes en échelle suggérant ainsi une population de cellules B polyclonale (ligne de gauche). En opposition à cette souris contrôle, la majorité des échantillons issus de tumeurs de souris *Cbp*^{WT/Δ}, *Cbp*^{Δ/Δ}, *Cbp*^{WT/Δ}x*EμBcl2*, et *Cbp*^{Δ/Δ}x*EμBcl2* montrent une seule bande dominante indiquant alors une population B clonale. 8 de ces bandes, surlignées en rouge, ont été excisées afin de réaliser un séquençage. L'analyse révèle la présence d'hypermutation dans 7 tumeurs sur 8 avec une moyenne de déviation de 2% (min = 0.8%, max = 4.2%) deviation from the germ-line V-gene sequence). Ces résultats montrent ainsi l'origine GCB de ces tumeurs, ou bien que les cellules B ont effectivement transitées par le GC. Abréviations mentionnées sur le schéma : NA, not applicable; SHM, somatic hypermutation. (D'après García-Ramírez, I et al. 2017)

Une autre approche de modélisation des GCB-DLBCL est basée sur l'étude de la mutation somatique de CREBBP. En effet, l'étude de Jiang et al (Jiang, Y et al. 2017) montre que la perte de CREBBP va permettre de faciliter le développement de lymphomes GCB chez la souris. La littérature montre en effet que chez l'Homme et chez la souris, la perte de CREBBP résulte en la perte de la fonction d'acétylation H3K27 sur des « enhancers » et du « silencing » aberrant des gènes normalement responsables de la modulation de la signalisation B et des réponses immunes dont le MHCII. Les « enhancers » dont la régulation dépend de CREBBP sont contre régulés par le répresseur transcriptionnel BCL6 en formant un complexe avec SMRT et HDAC3 eux-mêmes retrouvés dans les loci CMHII. La perte de fonction de HDAC3 entraîne donc la levée de la répression de ces « enhancers » et gènes associés, dont le CMHII, et supprime les lymphomes associés aux mutants CREBBP à la fois *in vivo* et *in vitro*. La perte de fonction de CREBBP a donc été associée au processus de lymphomagenèse en permettant la levée de la répression exercée sur les « enhancers » par les complexes

BCL6/SMRT/HDAC3 suggérant là aussi une approche de thérapie ciblée pour les lymphomes ayant des mutations CREBBP.

La construction de ce modèle murin de DLBCL est représentée en Figure 76.

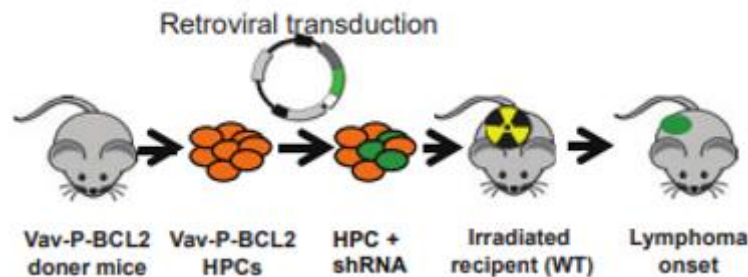


Figure 76. Stratégie de modèle murin mimant la perte de fonction CREBBP

Représentation schématique du modèle murin transgénique *VavP-Bcl2*. Ce modèle mime la génétique et la pathologie d'un FL humain (Oricchio, E. et al. 2011; Béguelin, W et al. 2013 ; Ortega-Molina, A. et al. 2015). Les cellules progénitrices hématopoïétiques *VavBcl2* sont transfectées dans un rétrovirus, avec fluorescence GFP, exprimant des shRNAs contre CREBBP (*VavP-Bcl2/Crebbp^{KD}*) ou un contrôle (*VavP-Bcl2/GFP*) et sont ensuite transplantées dans des souris WT (Wild Type sauvage) receveuses préalablement irradiées. (D'après Jiang, Y et al. 2017)

Le problème récurrent concernant les régulateurs épigénétiques est que les stades du développement B auxquels ont lieu les mutations de type KMT2D et CREBBP ne sont pas pleinement identifiés. C'est pourquoi la perte hémizygote et homozygote de ces gènes a été modélisée à différents stades de différenciation B en utilisant des souris avec une Cre spécifiquement active dans les CSH (Horton, S. J., Giotopoulos, G et al. 2017) ; aux stades B précoces (CD19 Cre et mb1Cre) (Zhang, J et al. 2015 ; Ortega-Molina, A et al. 2015 ; García-Ramírez, I et al. 2017 ; Zhang, J et al. 2017), et dans les GCB (via Cγ1-Cre recombinase) (Zhang, J et al. 2017 ; Meyer, S. N et al. 2019 ; Zhang, J et al. 2015).

Concernant la modélisation de la mutation KMT2D, qui normalement agit comme un puissant suppresseur de tumeur, il est possible d'éliminer ce gène au stade pré-B entraînant ainsi une expansion de la population GCB en réponse à un challenge antigénique comparé aux souris WT (Zhang J et al.2015 ; Ortega-Molina A et al. 2015). A noter que le changement de profil transcriptionnel des GCB se révèle plus flagrant dans des souris CD19-Cre par rapport aux souris où la délétion a été induite par la Cγ1-Cre. Il y donc une inactivation plutôt précoce de KMT2D dans le FL, cependant la perte seule de KMT2D n'est pas suffisante dans le GC pour aboutir au développement d'un lymphome. Il faut donc ajouter une mutation complémentaire comme une dérégulation BCL2 par exemple (observée dans le FL et le DLBCL). La coopération de ces 2 mutations entraîne alors des mutations des gènes IGHV et l'expression spécifique de marqueurs du GC. On parle donc d'effet synergétique entre la perte KMT2D et la dérégulation de BCL2.

Comme dit précédemment, EZH2 est une histone méthyltransférase fréquemment mutée dans les GCB-DLBCL. EZH2 est d'ailleurs requis pour la bonne formation des GC (*Béguelin, W et al. 2013 ; Caganova, M et al. 2013*). L'établissement des modèles murins de lymphomagenèse reposent alors sur 2 mutations clés entraînant des gains de fonction : Y646F (chez la souris équivalent à Y641) et Y646N. L'expression conditionnelle de l'allèle *Ezh2*^{Y641F} est modulée par le promoteur endogène d'EZH2 (*Béguelin W et al. 2016*) contrairement à l'expression de l'allèle transgénique *Ezh2*^{Y641N} sous le contrôle du promoteur fort CAG. Les deux allèles mutés sont induits sélectivement dans le GC après excision de la cassette lox-stop-lox grâce à la *Cy1-Cre*.

Ces modèles présentent une hyperplasie massive des GC, une prolifération aberrante, un blocage de la différenciation terminale B et une augmentation de la marque épigénétique H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes cibles d'EZH2. Comme les modèles précédemment cités, il faut des coopérations oncogéniques, dans ce cas c'est une coopération d'EZH2 avec le complexe répresseur BCL6/BCOR qui est décrite aboutissant à un phénotype proche des GCB-DLBCL (*Béguelin W et al. 2016*). Une coopération avec BCL2 est également décrite, grâce à un croisement avec des souris transgéniques *VavP-Bcl2* ou après par transferts de cellules de moelle de *VavP-Bcl2* transfectées avec des vecteurs *Ezh2*^{Y641F} (*Béguelin W et al. 2013 ; Béguelin W et al. 2016 ; Ennishi, D et al. 2019*).

Notons que la lignée *CD19Cre* montre ainsi une meilleure expression des mutants d'EZH2 sous contrôle de promoteurs B endogènes et donc un meilleur développement de lymphome mais, leur phénotype (*B220*⁺, *CD19*⁺, *IgM*⁺, *CD43*⁺, *CD5*⁺ and *Mac1*⁺) ne représente pas la situation retrouvée chez l'Homme. D'où l'intérêt primordial de maîtriser l'induction temporelle et spatiale de ces mutations dans l'établissement du modèle murin transgénique (*Souroullas, G. P e al. 2016*). Ainsi, les GEMM *Ezh2*; *Cy1-Cre* ont deux intérêts majeurs : ils permettent l'étude de la fonction additionnelle d'EZH2 dans l'établissement du microenvironnement tumoral et ils constituent un outil préclinique de choix pour de nouvelles approches thérapeutiques. En particulier parce que ces animaux développent des tumeurs répliquant le phénotype humain avec une baisse de l'expression CMHI et Il ainsi que l'atteinte immunologique sur le nombre de cellules T infiltrées qui sont capables d'être restaurées après traitement avec des inhibiteurs d'EZH2 (*Ennishi, D et al. 2019*).

Dans les FL et les GCB-DLBCL des mutations sur les histones de la famille H1 (*HIST1H1C* et *HIST1H1E*) sont également décrites (44% des FL et 26% des GCB-DLBCL) (*Okosun, J et al. 2014 ; Yusufova, N et al. 2021*). Il existe une coopération des mutations touchant H1C et H1E. Cela a pu être démontré dans un nouveau modèle double KO dont les GC sont plus nombreux après stimulation antigénique T-dépendante. Ce phénotype est notamment lié à la décompaction de la chromatine au niveau des gènes cibles de facteurs de cellules souches (*NANOG*, *SOX2* et *PRC2*). De plus, la transplantation de lymphome *VavP-Bcl2*; *H1c*^{-/+}*H1e*^{-/+}, dans des souris receveuses secondaires et tertiaires montre une prise de greffe de la tumeur à 100% , situation qui n'est pas observée avec des tumeurs *VavP-Bcl2* seules. Ces résultats montrent ainsi le caractère agressif de ces mutants de la famille H1.

Enfin des mutations inactivatrices sur *TET2*, qui est une dioxygénase, sont retrouvées dans 3 à 10% des FL/tFL et 6 à 12% des GCB-DLBCL (*Reddy, A et al. 2017 ; Chapuy, B et al. 2018 ; Schmitz, R et al. 2018 ; Pasqualucci, L. et al. 2014*). Une mutation conditionnelle KO

inactivatrice de TET2 entraîne alors une expansion des GCB dans les souris Vav-Cre et CD19Cre mais pas au stade GC. Cette mutation entraîne une hyperméthylation des gènes impliqués dans le programme de la zone claire du GC ayant des conséquences au niveau de la répression transcriptionnelle. Cependant, ce phénomène n'induit pas la progression clonale en GCB-DLBCL. Il faut donc là aussi, une stratégie combinatoire d'altérations génétiques à la fois sur TET2 et une dérégulation de BCL6 qui dans ce cas entraîne une désorganisation totale de l'architecture splénique due à de larges follicules et des infiltrats lymphoïdes. Ces travaux ont permis d'établir le lien potentiel entre TET2 et CREBBP dans la mise en place d'un programme transcriptionnel spécifique en faveur d'une sortie du GC au travers d'une acétylation CREBBP dépendante et une stabilisation de TET2 résultant en l'activation de domaines « enhancers » variés (Dominguez, P. M. et al. 2018).

Il est donc possible d'exploiter les différentes mutations propres aux FL et aux GCB-DLBCL dans le but d'établir un modèle murin transgénique plus ou moins fidèle à la pathologie de l'Homme. Nous avons également pu voir au travers de ces exemples les phénomènes de coopérations entre mutations dans le but d'initier la lymphomagenèse et modifiant les programmes transcriptionnels entraînant ainsi la transformation maligne. Il est également primordial de prendre en compte le stade de différenciation B dans lequel se produisent ces événements oncogéniques distincts pour aboutir au développement complet d'une tumeur. Enfin, l'influence du microenvironnement tumoral doit aussi être pris en compte dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

En dehors des mutations propres des FL et des GCB-DLBCL, on retrouve également des mutations qui affectent les interactions avec le microenvironnement tumoral. Ce microenvironnement peut servir de support pour la tumeur et lui permettre d'échapper à la surveillance immunitaire. Ainsi la perte du CMHI durant la transformation du FL vers un DLBCL résulte de mutations de certains composants du CMHI ou d'altérations au niveau de la transcription et le transport de ces entités, en faveur d'un échappement à la surveillance des LT-CD8 (Ennishi, D et al. 2019 ; Challa-Malladi, M et al. 2011 ; Fangazio, M et al. 2021). Une diminution du CMHII est associée aux FL et au GCB-DLBCL, en particulier pour les cas avec des mutations de CREBBP et d'EZH2. Il pourrait ainsi y avoir un lien entre ces reprogrammations épigénétiques et la capacité à échapper à la surveillance immunitaire dans ces tumeurs. Il serait donc intéressant d'établir de nouveaux modèles murins transgéniques ayant ces caractéristiques.

Un autre exemple de mutation affectant le microenvironnement tumoral est la perte de fonction de TNFRSF14 codant le récepteur HVEM qui est muté ou délété dans quasiment 30% des GCB-DLBCL (Boice, M et al. 2016 ; Karube, K et al. 2018). La modélisation de cette mutation *in vivo* par des shRNA a été utilisée pour induire un KO dans les cellules hématopoïétique des souris VavP-Bcl2 (Boice M et al. 2016). Là encore le modèle ne retranscrit pas exactement le timing parfait d'incidence de cette mutation dans la pathologie humaine cependant ces souris peuvent développer des FL dépendants de BCL2 de manière plus importante avec cet ajout de KO HVEM. Par conséquent la perte de HVEM modélise la stimulation du BCR et l'augmentation de la prolifération de manière autonome. La perte de HVEM est également à l'origine de la création d'un environnement favorable à la tumeur au travers d'une expression accrue de cytokines en lien avec la famille des TNF qui agissent comme de forts activateurs du stroma. Chez la souris et chez l'Homme, la perte de TNFRSF14 dans le FL montre une

forte activation lymphoïde du stroma. Du coup, ces recherches offrent alors de nouvelles perspectives thérapeutiques pour aborder au mieux ces altérations génétiques en faveur d'une signalisation BCR exubérante.

Il existe aussi des mutations activatrices sur MEF2B qui est un facteur de transcription exclusivement exprimé dans le GC (*Ying CY et al. 2013*) et responsable de la régulation du programme transcriptionnel de gènes impliqués dans diverses fonctions biologiques et la régulation en particulier de BCL6 (*Brescia P et al. 2018*). Cette activité peut être perturbée dans environ 15% des FL et des GCB-DLBCL. Les mutations MEF2B sont plutôt induites aux stades précoces du développement B et la mutation la plus connue est celle sur le domaine N-terminal D83V. Un modèle de KI croisé avec une souris CD21-Cre est publié (*Brescia P et al. 2018*). Ainsi, la souris *Mef2b^{+D83V}; Cd21-Cre* est caractérisée par des lymphomes dérivés du GC, une forte réponse du GC et le développement clonal de FL et de GCB-DLBCL dans 20% des cas. La pénétrance de ces lymphomes est augmentée si ces souris sont croisées avec souris porteuses de l'allèle BCL2-Ig.

Des mutations retrouvées dans un tiers des GCB-DLBCL concerne l'axe de signalisation Gα13. Deux modèles de KO conditionnels ont été développés. En conditions physiologiques, Gα13 est responsable du confinement des cellules GCB et stimule la voie AKT. Le gène muté ici est le *GNA13* et de façon plus rare *S1PR2* et *ARGHGEF1* (*Muppidi, J. R et al. 2014*). La mutation engendrant de bas niveaux d'expression de S1PR2 est tout particulièrement corrélée à un mauvais pronostic dans les DLBCL (*Flori, M et al. 2016*). Concernant les modèles murins établis, ce sont des KO conditionnels où GNA13 va être spécifiquement délété dans les GCB par croisement avec des souris AICDA-Cre (*Healy, J. A et al. 2016*) dont nous reparlerons dans la description du modèle murin de ma thèse. L'autre stratégie consiste à dépléter GNA13 dans toutes les cellules B en utilisant un mélange de moelle osseuse de chimère *Gna13^{fl/fl}; mb1-Cre* (*Muppidi, J. R et al. 2014*). Dans les deux modèles survient : un accroissement du nombre de GCB, une architecture désordonnée du GC et une distribution LZ/DZ altérée tout comme une activité de SHM aberrante et des migrations B anormales. Ces résultats supportent ainsi l'hypothèse selon laquelle la voie Gα13 est impliquée dans les processus de lymphomagenèse et peut ainsi mimer le développement d'un GCB-DLBCL avec un taux de réussite dans environ 1 souris sur 2 (*Cattoretti, G et al. 2009*).

La protéine FBXO11, membre de la famille des protéine F-box, fonctionne en tant que protéine de dégradation de signalisation cellulaire. FBXO11 est une sous-unité du complexe SKP1-cullin-1-F-box-protein (SCF) E3 ligase qui conduit à l'ubiquitinylation et la dégradation de protéines cibles dont BCL6 et BLIMP1 (*Duan, S et al. 2012 ; Skaar, J. R., Pagan, J. K., & Pagano, M 2013 ; Horn, M et al. 2014*). C'est donc en toute logique que des mutations monoalléliques surviennent sur FBXO11 dans les DLBCL, ce phénomène étant corrélé bien entendu à des niveaux d'expression de BCL6 augmentés. Le modèle de choix est donc une souris dans laquelle a été réalisé un KO conditionnel FBXO11 croisée avec une souris *Cy1-Cre* afin d'étudier le lien entre la perte de FBXO11 et la formation de GC : GC anormalement larges et des niveaux protéiques de BCL6 exacerbés après stimulation antigénique (*Schneider, C et al. 2016*). A long terme, les souris vont ainsi développer des pathologies lymphoprolifératives dont certaines possèdent les caractéristiques d'un GCB-DLBCL. Cependant, la pénétrance étant faible, il est impératif de combiner cette mutation FBXO11 avec d'autres altérations génétiques.

Nous avons donc pu voir, au travers de ces différents exemples de modèles murins transgéniques, la complexité d'obtenir un modèle fidèle récapitulatif de la pathologie humaine. Très fréquemment, il est nécessaire de muter de façon combinée les altérations clés identifiées dans les DLBCL afin de pouvoir obtenir une tumeur et cela souvent à long terme.

IV.3 Modèle de suractivation de NF- κ B mimant un DLBCL

Etant donné la place centrale de NF- κ B dans mes travaux de thèse, nous allons développer dans un dernier paragraphe les modèles murins disponibles dans la littérature pour mimer la suractivation de NF- κ B dans un contexte de mutations récurrentes dans les DLBCL.

Dans les parties précédentes, nous avons décrits le rôle clé des sous-unités NF- κ B en conditions physiologiques et pathologiques. Les mutations pouvant affecter cette voie NF- κ B peuvent à la fois avoir lieu sur des activateurs et des répresseurs de la transduction du signal. J'ai déjà évoqué le modèle comportant la mutation Myd88^{L252P} dans des souris CD19Cre ou Cy1-Cre promouvant la formation de tumeurs de type ABC (*Knittel, G et al. 2016*) associé au cluster MCD/C5 souvent en lien avec un gain de copie BCL2. C'est pourquoi ce modèle croisé avec une souris CD19Cre permettant la surexpression de BCL2 conduit à une augmentation des tumeurs de types ABC (*Flümann, R et al. 2021*). Par ailleurs, une accumulation de cellules auto-réactives va être causé par un effet synergétique des mutations Myd88^{L252P} et de CD79B (*Wang, J. Q et al. 2017*). Bien que ces souris ne développent pas un lymphome B agressif de manière systématique, ces modèles contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques liés à NF- κ B.

Pour la voie non canonique/alternative de NF- κ B, il est possible d'obtenir une activation constitutive par la translocation nucléaire de p52 médiée par des mutations touchant TRAF3 et BCL6 (*Compagno, M et al. 2009*). TRAF3 est impliqué dans l'axe de régulation négatif de la voie non canonique NF- κ B impliquant la dégradation de la kinase NIK. Il est donc possible de réaliser un mutant conditionnel μ HABcl6; Nik^{stopFL}; Cy1-Cre où NIK et BCL6 sont surexprimés dans le GC. On retrouve alors une hyperplasie du GC avec un blocage de la différenciation terminale B et le développement d'un DLBCL IRF4 positif (*Zhang, B et al. 2015*). Un autre modèle illustrant la synergie de mutations avec la dérégulation de NF- κ B est le modèle combinant la perte de BLIMP1 avec une hyperactivation d'IKK2 : souris Blimp1^{fl/fl}; Rosa26^{stopFL}Ikk2ca (constitutivement actif) ; Cy1-Cre (*Calado, D. P et al. 2010*).

L'ensemble de ces modèles liés à une activation de NF- κ B a donc permis de démontrer l'implication de cette voie dans la lymphomagenèse B. En ce sens, le modèle récemment publié de Kober-Hasslacher et al. (*Kober-Hasslacher, M et al. 2020*) pose la question des conséquences d'une surexpression *in vivo* de la sous-unité c-Rel NF- κ B. Comme nous l'avons précédemment évoqué, les conséquences fonctionnelles d'une surexpression de c-Rel ne sont pour le moment pas toutes connues malgré la démonstration *in vitro* du pouvoir oncogénique de c-Rel, et l'amplification récurrente 2p16 dans les GCB-DLBCL. Les auteurs proposent ainsi un modèle de surexpression de c-Rel dans les LB à partir d'une construction transgénique spécifique : dite « BAC-transgenic gene loci » (Figure 77).

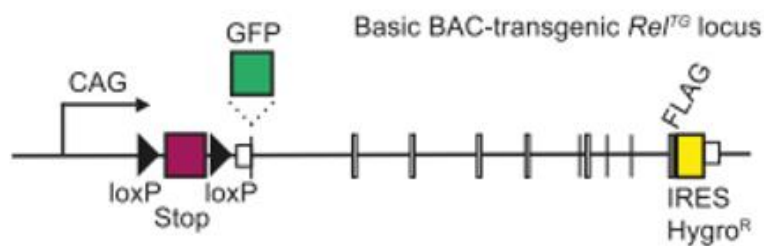


Figure 77. Schéma de la construction KI de c-Rel dans le locus Basic BAC Transgénique

Représentation schématique du transgène REL^{TG} et $REL^{TG}GFP$ contenu dans un BAC (Bacterial artificial chromosome) transgéniques. Le promoteur CAG est suivi d'une cassette stop lox-P-flanquée, un site N-Terminal-Tag ou Fusion GFP ainsi qu'un site carboxy-terminal flag-tag ont été insérés. (D'après Kober-Hasslacher, M et al. 2020).

Le locus du gène REL n'est pas modifié en utilisant la technique du BAC (Bacteria Artificial Chromosome). L'expression B spécifique de c-Rel (et c-Rel-GFP) va se faire via une Cre sous contrôle d'un promoteur B spécifique. Un promoteur fort CAG (suivi de la cassette stop entourée par des sites LoxP en amont du premier exon de *REL*) permettra l'expression de c-Rel après délétion de la cassette stop. Le BAC modifié pour la surexpression de c-Rel est ensuite introduit dans des cellules ES et les clones porteurs d'une copie du BAC vont être identifiés via la technique de Southern-Blot. Pour le KI B spécifique, ces souris ont été croisées avec des souris CD19Cre. La caractérisation spécifique du modèle montre que les populations B de la moelle, de la rate et de la cavité péritonéale restent inchangées dans la souris Rel^{TG} CD19Cre^{fl/+} ; mais une proportion cellulaire plus importante est détectée au niveau des organes périphériques comme les ganglions et les plaques de Peyer. Au niveau des marqueurs d'activation de surface, il n'y a pas de modifications majeures si ce n'est une petite élévation du CD23 dans les cellules B périphériques. A l'inverse, la surexpression de c-Rel va induire de façon spontanée la formation de GC dans la rate, les ganglions lymphatiques mais aussi dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse du système digestif (GALT, gut-associated lymphoid tissues). Cette expansion de cellules GCB vont alors exprimer des niveaux normaux de BCL6 et des marqueurs clés de l'environnement du GC dont GL7 et PNA. Une proportion de cellules a ainsi tendance à exprimer fortement CD86 et de manière moins importante CXCR4 au niveau de la LZ. L'hyperplasie des GC est également accompagnée par une augmentation des populations T dans les ganglions lymphatiques dont les Tfh CD4+ PD1hi CXCR5hi capables de promouvoir des signaux/interactions clés afin de garantir le bon déroulé des réactions du GC. L'expansion des Tfh est particulièrement importante dans la rate, dans les ganglions lymphatiques et les GALT. La première conséquence d'une surexpression de c-Rel est donc la formation de GC de manière spontanée.

L'étude démontre ensuite que les niveaux protéiques de c-Rel vont dicter l'expansion des GCB et induire le « switch » des cellules plasmatisques. De façon surprenante, l'induction d'une surexpression de c-Rel dans des souris c-Rel déficientes va permettre de restaurer la différenciation B terminale et donc souligner ce rôle critique intrinsèque de cette sous-unité NF- κ B au stade terminal de la cellule B. La surexpression de c-Rel dans les cellules GCB va causer sa translocation au noyau, phénomène que nous avons déjà mentionné précédemment, causant alors la génération d'un programme transcriptionnel altéré et une

prolifération augmentée (Figure 78). Enfin, l'une des dernières observations faites dans ces souris surexprimant c-Rel est l'augmentation de la production d'autoanticorps ainsi que leur dépôt au niveau du rein.

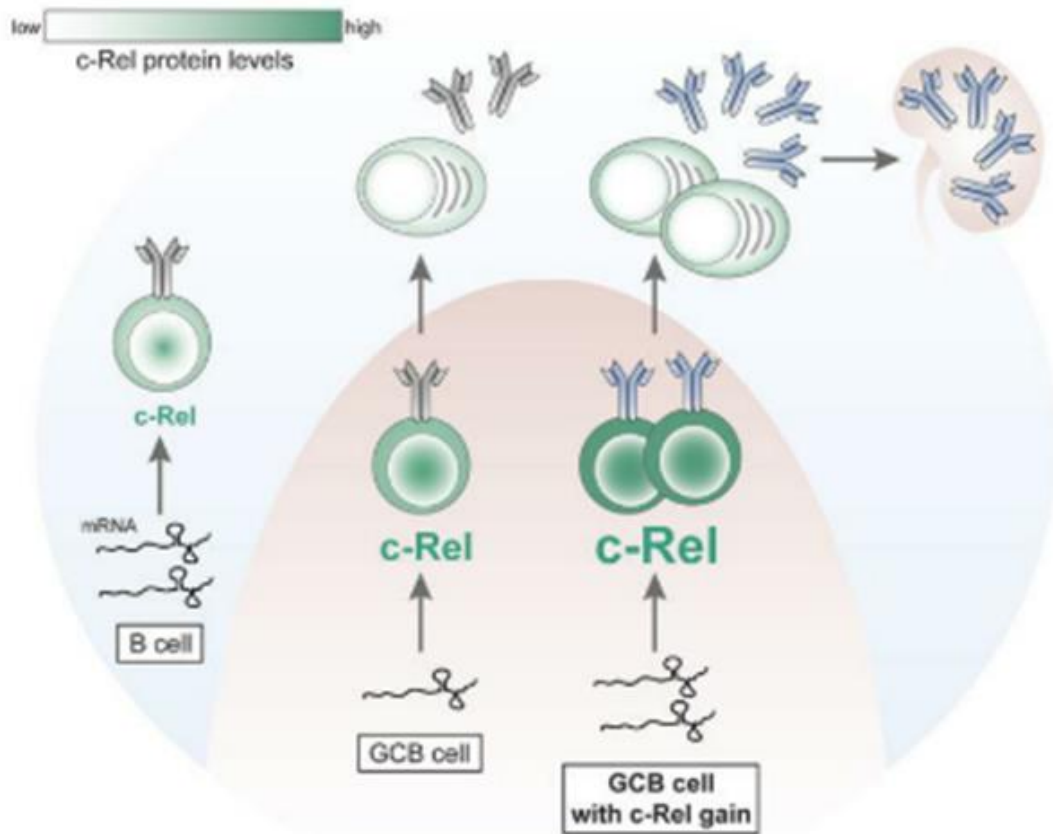


Figure 78. **Schéma bilan des conséquences de la surexpression de c-Rel in vivo** (D'après Kober-Hasslacher, M et al. 2020)

La surexpression de c-Rel va induire un gain important de niveaux protéiques de c-Rel dans les B du GC en particulier et entraîner la formation et le dépôt de complexes immuns au niveau du rein.

Nous discuterons ce modèle dans la partie discussion de ma thèse au regard de mes propres résultats.

Objectifs

Nous avons donc pu voir au travers de cette introduction, la place de la famille REL/NF- κ B dans la réponse immunitaire, ses sous-unités activatrices et ses voies de signalisation classique et alternative. NF- κ B et ses sous-unités RelA, RelB et c-Rel sont impliquées dans les processus de différenciation et de maturation de la cellule B comme nous l'avons exposé dans le Chapitre 2.

En lien avec la complexité des différentes étapes de différenciation B, particulièrement dans l'environnement du centre germinatif, de nombreux évènements mutationnels peuvent survenir lors de ce processus. Les DLBCL illustrent bien la complexité des anomalies génétiques des B-LNH.

Les DLBCL sont les lymphomes les plus en lien avec NF- κ B et représentent plus de 80% des lymphomes B agressifs. La caractérisation de l'activité NF- κ B dans sa globalité au travers de l'étude de ses gènes cibles, comme cela est habituellement proposé dans la littérature scientifique, n'aborde qu'une partie de la complexité de cette famille de facteurs de transcription en ne prenant pas en compte le rôle propre des sous-unités NF- κ B. Dans ce contexte, j'ai participé dans les premiers mois de ma thèse à une étude du groupe menée avec le LYSA (The Lymphoma Study Association). **Dans cette étude, nous avons posé la question du rôle propre des sous-unités NF- κ B dans les DLBCL.** Les résultats publiés montrent que les sous-unités NF- κ B doivent être prises en compte de façon différentielle. Tel que RelB est un marqueur de mauvais pronostic (*Eluard B et al. 2022*), RelA est la sous-unité du sous-type moléculaire ABC et c-Rel celle des GCB-DLBCL avec une signature transcriptomique nouvelle propre (*Faumont N et al. 2021*). Pour c-Rel, son activité de liaison à l'ADN est associée à une expression accrue des transcrits du gène *REL*. En dépit de la fréquente amplification du locus *REL* (15 à 37% des cas selon les séries (*Schmitz R et al. 2018*)), les GCB-DLBCL ont longtemps été décrits comme indépendants de NF- κ B. Nos données suscitées montrent **qu'en réalité les GCB sont liés à c-Rel avec un profil d'expression génique qui ne correspond pas aux gènes cibles classiques de NF- κ B.**

Nous formulons ainsi l'hypothèse que c-Rel confère un avantage sélectif dans l'environnement spécifique du centre germinatif. **L'objectif global de ma thèse est donc d'étudier les conséquences d'une surexpression et activation aberrante de c-Rel *in vivo* qui pourrait favoriser la tumorigénèse dans les cellules précurseurs du GCB-DLBCL en perturbant la dynamique normale du développement de la cellule B dans le centre germinatif.** Pour ce faire, j'ai développé un modèle murin original inductible « double couleur » qui permet d'étudier la dynamique de l'émergence clonale dans le centre germinatif afin d'identifier les gènes cibles clés de c-Rel dans la transformation des LB pour, en second temps, en comprendre non seulement la régulation par c-Rel mais aussi l'impact fonctionnel sur la cellule B du centre germinatif.

Références

Camicia, R., Winkler, H. C., & Hassa, P. O. (2015). Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Molecular cancer*, *14*, 1-62.

Eluard, B., Nuan-Aliman, S., Faumont, N., Collares, D., Bordereaux, D., Montagne, A., ... & Baud, V. (2022). The alternative RelB NF- κ B subunit is a novel critical player in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *139*(3), 384-398.

Faumont, N., Taoui, O., Collares, D., Jais, J. P., Leroy, K., Prévaud, L., ... & Feuillard, J. (2021). c-Rel Is the Pivotal NF- κ B Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study. *Frontiers in oncology*, *11*, 1064. 10.3389/fonc.2021.63889

Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., ... & Staudt, L. M. (2018). Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, *378*(15), 1396-1407.

Résultats

Introduction

Comme nous avons pu le voir au cours de l'introduction, l'étude des DLBCL représente un enjeu majeur de prise en charge thérapeutique pour les patients. Ainsi, la recherche dispose d'approches *in vitro* et *in vivo* plus ou moins complexes.

Dans cette partie Résultats, vous trouverez dans le Chapitre 1, une étude de caractérisation des sous-unités NF- κ B dans les tumeurs de DLBCL, puis dans le Chapitre 2, une étude du rôle *in vivo* de c-Rel/NF- κ B spécifiquement dans les lymphocytes B du centre germinatif.

Chapitre 1. c-Rel sous-unité pivot du sous-type GCB-DLBCL

A partir de la série du programme GHEDI (Deciphering the Genetic Heterogeneity of Diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era) référencée par le LYSA, nous montrons que l'activité de liaisons à l'ADN de c-Rel est caractéristique des GCB-DLBCL.

Pour comprendre la place de l'activité c-Rel dans l'émergence des GCB-DLBCL, nous corrélons nos données d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) aux données de transcriptome haut-débit déjà acquises sur la série GHEDI. Nous pouvons ainsi définir un profil transcriptomique spécifiquement associé à c-Rel dans les GCB-DLBCL (343 sondes). Nous avons ensuite validé cette signature c-Rel sur l'ensemble de la série GHEDI (168 tumeurs avec 85 GCB et 83 ABC) ainsi que sur la série publiée par Lenz et al. en 2008 (200 DLBCL avec 107 GCB et 93 ABC) (Lenz et al., 2008) : environ 70% des GCB ont un profil d'expression c-Rel dans les deux séries. Notons que ces tumeurs sont plus fréquemment associées *i*) à la surexpression de c-Rel (~ 80% des cas), *ii*) à l'amplification du locus REL, et *iii*) aux anomalies des gènes *BCL2*, *MEF2B*, *CREBBP*, *TNFRSF14* et *EZH2* qui correspondent au sous-type génétique EZB (défini par Staudt et al. (Schmitz et al., 2018)). Probablement en lien avec une moindre complexité génomique (relative au nombre de copies de gènes), l'analyse de la survie globale des patients à 5 ans indique une meilleure évolution pour ceux avec un profil c-Rel (*i.e.* signature transcriptomique associée à la surexpression de c-Rel, 50-60% des GCB-DLBCL). Ce bon pronostic est également retrouvé parmi les GCB uniquement et ce pour les deux séries étudiées.

Mon intervention sur ce projet concerne les aspects fonctionnels réalisés à partir des cellules B EREB2.5 immortalisées par le virus d'Epstein-Barr. Ainsi, nous montrons que la surexpression de c-Rel induit sa localisation nucléaire et protège les cellules contre l'apoptose, tandis que sa répression reverse cet effet protecteur. **Ces résultats indiquent que, cliniquement et biologiquement, c-Rel est la sous-unité pivot de NF- κ B dans le sous-groupe GCB-DLBCL. Sur le plan fonctionnel, la surexpression de c-Rel pourrait favoriser directement la tumorigenèse du DLBCL sans qu'il soit nécessaire de recourir à d'autres signaux d'activation (Frontier in Oncology 2021 ; (Faumont et al., 2021)).** Ce travail est le point de départ qui a motivé l'établissement du modèle murins surexprimant c-Rel dans les lymphocytes B du centre germinatif, présenté dans le chapitre suivant.



c-Rel Is the Pivotal NF- κ B Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study

Nathalie Faumont¹, Oussama Taoui¹, Davi Collares², Jean-Philippe Jais³, Karen Leroy⁴, Léa Prévaut¹, Fabrice Jardin⁵, Thierry J. Molina^{2,6}, Christiane Copie-Bergman⁷, Barbara Petit⁸, Marie-Pierre Gourin⁹, Dominique Bordessoule^{1,9}, Danielle Troutaud¹⁰, Véronique Baud^{2*} and Jean Feuillard^{1*}

¹ CNRS UMR-7276, INSERM U1262, CRIBL, University of Limoges, and Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, Limoges, France, ² Université de Paris, NF- κ B, Differentiation and Cancer, Paris, France, ³ Biostatistics Department, Imagine Institute, Paris, France, ⁴ UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris Descartes University, CARPEM, Department of Genetics and Molecular Biology, Cochin Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France, ⁵ Inserm U1245 and Department of Henri-Becquerel Hematology Center and Normandie Univ UNIROUEN, Rouen, France, ⁶ Pathology Department, Necker Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, ⁷ IMRB-Inserm U955, AP-HP Henri-Mondor Hospital, Créteil, France, ⁸ Pathology Department, CHU of Limoges, Limoges, France, ⁹ Regional Reference Structure of Limousin Lymphomas, Clinical Hematology Department, CHU of Limoges, Limoges, France, ¹⁰ EA3842, CAPTuR, University of Limoges, Limoges, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Stefano Luminari,
University of Modena and Reggio
Emilia, Italy

Reviewed by:

Valentina Tabanelli,
European Institute of Oncology (IEO),
Italy

Alessandro Isidori,
AORMN Hospital, Italy

*Correspondence:

Véronique Baud
veronique.baud@inserm.fr
Jean Feuillard
jean.feuilleard@unilim.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Hematologic Malignancies,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 07 December 2020

Accepted: 15 March 2021

Published: 20 April 2021

Citation:

Faumont N, Taoui O, Collares D,
Jais J-P, Leroy K, Prévaut L, Jardin F,
Molina TJ, Copie-Bergman C, Petit B,
Gourin M-P, Bordessoule D,
Troutaud D, Baud V and Feuillard J
(2021) c-Rel Is the Pivotal NF- κ B
Subunit in Germinal Center Diffuse
Large B-Cell Lymphoma:
A LYSA Study.
Front. Oncol. 11:638897.
doi: 10.3389/fonc.2021.638897

Relationships between c-Rel and GCB-DLBCLs remain unclear. We found that strong c-Rel DNA-binding activity was mostly found in GCBs on two independent series of 48 DLBCLs and 66 DLBCLs, the latter issued from the GHEDI series. c-Rel DNA-binding activity was associated with increased *REL* mRNA expression. Extending the study to the whole GHEDI and Lenz DLBCL published series of 202 and 233 cases, it was found that the c-Rel gene expression profile (GEP) overlapped partially (12%) but only with the GCB GEP and not with the GEP of ABC-DLBCLs. Cases with both overexpression of *REL* mRNA and c-Rel GEP were defined as those having a c-Rel signature. These cases were GCBs in 88 and 83% of the GHEDI or Lenz's DLBCL series respectively. The c-Rel signature was also associated with various recurrent GCB-DLBCL genetic events, including *REL* gains, *BCL2* translocation, *MEF2B*, *EZH2*, *CREBBP*, and *TNFRSF14* mutations and with the EZB GCB genetic subtype. By CGH array, the c-Rel signature was specifically correlated with 2p15-16.1 amplification that includes *XPO1*, *BCL11A*, and *USP34* and with the 22q11.22 deletion that covers *IGLL5* and *PRAME*. The total number of gene copy number aberrations, so-called genomic imbalance complexity, was decreased in cases with the c-Rel signature. These cases exhibited a better overall survival. Functionally, overexpression of c-Rel induced its constitutive nuclear localization and protected cells against apoptosis while its repression tended to increase cell death. These results show that, clinically and biologically, c-Rel is the pivotal NF- κ B subunit in the GCB-DLBCL subgroup. Functionally, c-Rel overexpression could directly promote DLBCL tumorigenesis without need for further activation signals.

Keywords: NF- κ B, DNA binding activity, c-Rel, germinal center B-cell-diffuse large B-cell lymphoma, genetic alterations

INTRODUCTION

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are the most frequent among aggressive non-Hodgkin's lymphomas (NHLs). DLBCLs are clinically, molecularly, and genetically heterogeneous, suggesting different oncogenic mechanisms. Gene-expression profiling (GEP) studies led to the proposal of two cell-of-origin (COO) molecular subtypes known as germinal center B-cell-like (GCB) DLBCLs, and activated B-cell like (ABC) DLBCLs, with a subset of cases showing an intermediate, unclassifiable phenotype (1). GCB-DLBCLs seem to arise from normal germinal center B-cells, whereas ABC-DLBCLs would originate from post-germinal center activated B-cells arrested before terminal plasma cell differentiation.

When compared to GCB-DLBCLs, several studies have shown that ABC-DLBCLs are the more aggressive subtype with the worst patient outcome (2, 3). ABC-DLBCLs exhibit constitutive activation of the NF- κ B pathway that drives tumor proliferation and survival and confers chemotherapy resistance (4). Constitutive activation of NF- κ B in ABC-DLBCLs is due to a variety of mutations in NF- κ B regulator coding genes, such as *MYD88*, *TNFAIP3* (A20), *CD79A/B*, *CARD11*, *TRAF2*, *TRAF5*, *MAP3K7* (TAK1), or *TNFRSF11A* (RANK) (5).

In contrast to ABC-DLBCLs, GCB-DLBCLs do not exhibit a NF- κ B transcriptomic signature (1). GCB-DLBCL is the most frequent DLBCL subtype and, with primary mediastinal B-cell lymphomas (PMBLs), represents almost all DLBCL cases diagnosed in children, adolescents, and young adults (6). Genetic abnormalities strongly associated with GCB-DLBCLs result in epigenetic modifications such as histone methylation or acetylation (*EZH2*, *EP300*, *CREBBP*, *KMT2D*), B-cell migration (*GNAI3*, *GNAI2*, *SIPR2*), PI3K/AKT/mTOR pathway activation (*FOXO1*, *SGK1*, *PTEN*), and immune-regulation (*TNFRSF14*) (5). Additionally, the t(14;18) translocation that brings *BCL2* under the control of IGH locus regulatory regions is detected in about 30% of GCB-DLBCLs but is rarely found in ABC-DLBCLs (7). Despite being reported at variable frequencies ranging 15 to 37%, the *REL* locus (2p16 region) gains including amplification (\geq four copies) are among the most frequently observed alterations in the GCB subtype (8). *REL* gains are also recurrent gene abnormalities in other hematopoietic cancers such as classical Hodgkin's lymphoma, follicular lymphoma, MALT lymphoma, Burkitt's lymphoma, and PMBL.

The *REL* gene encodes the c-Rel subunit of NF- κ B. c-Rel was first identified as a cellular homolog of the avian retroviral oncoprotein v-Rel, which rapidly causes fatal lymphoid cell tumors in young birds (9). Like the other members of the NF- κ B family, c-Rel is characterized by the presence of a highly conserved amino-terminal domain so called RHD (*Rel Homology Domain*) responsible for dimerization, DNA-binding, and I κ B inhibitory protein binding. c-Rel is the only member of the NF- κ B family that can transform avian lymphoid cells *in vitro* (10). Artificial mutants of c-Rel indicate that the transactivation domain in the carboxy-terminal part is responsible for this transforming potential (11).

The role of c-Rel is important in many aspects of lymphoid cell function. Expression of c-Rel is ubiquitous in B-cells and increases during B-cell development, particularly in germinal center B-cells (12). Experimental ectopic c-Rel expression blocks plasma cell differentiation by inhibiting the expression of the transcription factor Blimp1 (13). Reciprocally, c-Rel is repressed by Blimp1 through its binding to the *REL* locus when the plasma cell differentiation process is engaged (13). Transgenic mice lacking c-Rel develop normally without effects on hematopoietic bone marrow development, but exhibit numerous peripheral immunological defects, including reduced proliferation and activation of mature B-cells in response to mitogenic stimuli, impaired germinal center formation, and reduced numbers of B-cells in the marginal area (14). Furthermore, inhibition of c-Rel by small hairpin RNA results in reduced cell survival and cell cycle progression in murine lymphoma B-cell lines (15). Recently, establishment of a B-cell specific c-Rel overexpressing mouse model demonstrated that c-Rel led to expansion of germinal center B-cells (16). All these data underscore a direct link between c-Rel and B-cells especially those of the germinal center.

Despite its association with *REL* amplification, it is notorious that GCB-DLBCLs do not exhibit NF- κ B signature. This paradox led to question the functional relationship between c-Rel and GCB-DLBCLs. To shed light on the role of c-Rel in these tumors, we analyzed c-Rel DNA-binding activity in DLBCLs together with the gene expression profile of tumors, patient survival, genetic abnormalities, and *REL* imbalances. The role of c-Rel on apoptosis was functionally evaluated *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Tumors and Patient Cohorts for EMSA Studies, Transcriptomic and Overall Survival Analyses

Clinical data of the patients studied are presented in **Supplementary Tables S1** and **S2** and in **Supplementary Materials and Methods**. Tumors were diagnosed according to the World Health Organization classification (17). The study was performed with approval of an Institutional review board and written informed consent was obtained from all participants at the time of enrollment. All tumor samples were reviewed for tumor infiltration, and selected cases were those for which tumor infiltration was over 90%. EMSA and transcriptomic analysis (HG133 +2.0 Affymetrix Gene Chip microarray; accession number GSE87371; **Supplementary Table S3**) were performed on frozen material (see **Supplementary Materials and Methods** for details).

Survival and Cox multivariate analysis was done with the Survival package (URL: <https://github.com/therneau/survival>). Overall survival (OS) was evaluated from the date of enrollment to the date of death from any cause. C-Harrel

concordance index was calculated as described (18). Details are given in the **Supplementary Materials and Methods**.

Real-Time Quantitative Reverse-Transcription PCR

Quantification of REL mRNA was done after extraction of total RNA from frozen biopsies using the TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Expression Assays: REL, Hs00968436_m1; and HPRT1, Hs02800695_m1. The HPRT1 gene was used as a reference gene for the control of amplification (details are in **Supplementary Materials and Methods**).

Analysis of Gene Copy Number Aberrations; BCL2, BCL6, and MYC Translocations; and Oncogenic-Related Mutations

Gene copy number aberrations were identified by performing Comparative Genomic Hybridization (CGH) on 180 patients after whole-genome amplification, using Agilent SurePrint G3 4 × 180 K microarrays, and analysis was done with GISTIC version 2.0.22 as previously described (19). Genomic imbalance complexity was calculated as the number of all gene loci for which the GISTIC score was -2 (homozygous deletion) or +2 (copy number gain of 2+ copies).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for BCL2, BCL6, and MYC translocations was performed as previously detailed (19). Probes are listed in the **Supplementary Materials and Methods**.

The Lymphopanel was designed to identify mutations in 34 important lymphomagenesis genes as detailed previously (19). NGS data was available for 213 patients. Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) Sequencing and PGM data analysis were performed as previously described (19).

Eukaryote Expression Vectors and Cell Lines

Complementary DNAs (cDNAs) for REL, super-repressor IκBα_{S32,36A,12}, IκBε, and Luciferase were cloned into the previously described pRT-1 doxycycline-inducible episomal vector (20). The inducible bidirectional promoter allows concomitant expression of the cDNA of interest and a membrane marker, truncated NGFR (NGFRt). The GCB SUDHL-4 cell line is from the L Staudt group (4). The cell cycle arrested EREB2-5 cell line is described in the **Supplementary Materials and Methods** and has been published (21). Cytoplasm and nuclear extracts and immunoblot were performed as previously described (20). Antibodies and apoptosis experiments are described in the **Supplementary Materials and Methods**.

RESULTS

DNA-Binding Activity of c-Rel Was Related to GCB-DLBCLs

We studied the REL mRNA expression and DNA-binding activity on a test series of 48 DLBCLs classified as GCB (30/48) or non-GCB (18/48) according to the Hans's algorithm

(see **Supplementary Figure S1** for the analysis pipeline). As shown in **Figure 1A**, REL mRNA levels tended to be higher in GCB-DLBCLs (Mann-Whitney Test, $p = 0.0016$). EMSA with super-shift was performed to assess the RelA and c-Rel DNA-binding activities for 32 frozen tumor samples (19 GCBs and 13 non-GCBs; **Figure 1B** as a typical result). A high c-Rel DNA-binding activity was defined as a c-Rel DNA-binding higher than that of RelA in gel shift assays. Using this criterion, patients were divided into those with a high and a low or negative c-Rel DNA-binding activity. High c-Rel DNA-binding activity was more frequently found in GCB-DLBCLs when compared to non-GCB subgroup (**Figure 1C**, Fisher's Exact Test, $p = 0.0497$). Cases with strong c-Rel DNA-binding were those with increased REL mRNA expression (**Figure 1D**, Mann-Whitney Test, $p < 0.0001$).

To confirm these results, an independent series of 66 DLBCLs, 43 ABCs, and 23 GCBs classified according the cell of origin and issued from the GHEDI cohort (22) was analyzed. A typical EMSA result with c-Rel DNA-binding-high, low, or negative is shown in **Figure 1E**. Consistently with the test series, the 10/13 (77%) DLBCL cases with high c-Rel binding were GCBs, while most low or negative c-Rel binding cases were ABCs (**Figure 1F**, Fisher's Exact Test, $p = 0.0008$).

The c-Rel Signature Is a Hallmark of the Majority of GCB-DLBCLs

To identify c-Rel DNA-binding activity associated genes, the Affimetrix gene expression profiles of the 13 DLBCL cases of the GHEDI series with a high c-Rel DNA-binding activity were compared to the 53 other cases with a low or negative c-Rel DNA-binding activity (see **Supplementary Figure S2** for the experimental design and the analysis pipeline). With a fold change of two and a Benjamini-Hochberg adjusted p -value below 0.05 between high and low or negative c-Rel binding cases, a set of 343 probesets/237 genes was selected after LIMMA analysis (**Supplementary Table S4**). This c-Rel gene expression profile (GEP) was used to clusterize the entire GHEDI series (83 ABCs, 85 GCBs, and 34 Others). PMBLs were excluded from the analysis. As shown in **Figure 2A**, 74/202 (37%) cases exhibited a c-Rel GEP: 63/85 (74%) GCBs, 3/83 (4%) ABCs, and 8/34 (24%) Others. Among the 128 patients with a non-c-Rel GEP 80 (63%), 22 (17%), and 26 (20%) were ABCs, GCBs, and Others respectively (Chi2 Test, $p < 10^{-6}$).

Of note, the 10 GCB-DLBCLs with a high c-Rel DNA-binding activity by EMSA were all coclusterized with patients exhibiting the c-Rel GEP. In contrast, 47/53 (89%) EMSA cases with low or negative c-Rel DNA-binding activity were coclusterized with patients that did not exhibit the c-Rel GEP (Fisher's exact test, $p = 8.10^{-6}$). Therefore, GEP and EMSA results were highly concordant, strongly suggesting that c-Rel was transcriptionally active and showing the c-Rel GEP was indeed associated with a majority of GCB-DLBCLs.

To validate this result, the DLBCL series published by Lenz et al. (23) (93 ABCs, 107 GCBs and 33 Unclassified) was also analyzed with these 343 probesets. As shown in **Figure 2B**, this analysis gave similar results since 90/233 (39%) cases were clusterized together with the c-Rel GEP, among them 72/107 (67%) GCBs, 7/93 (8%)

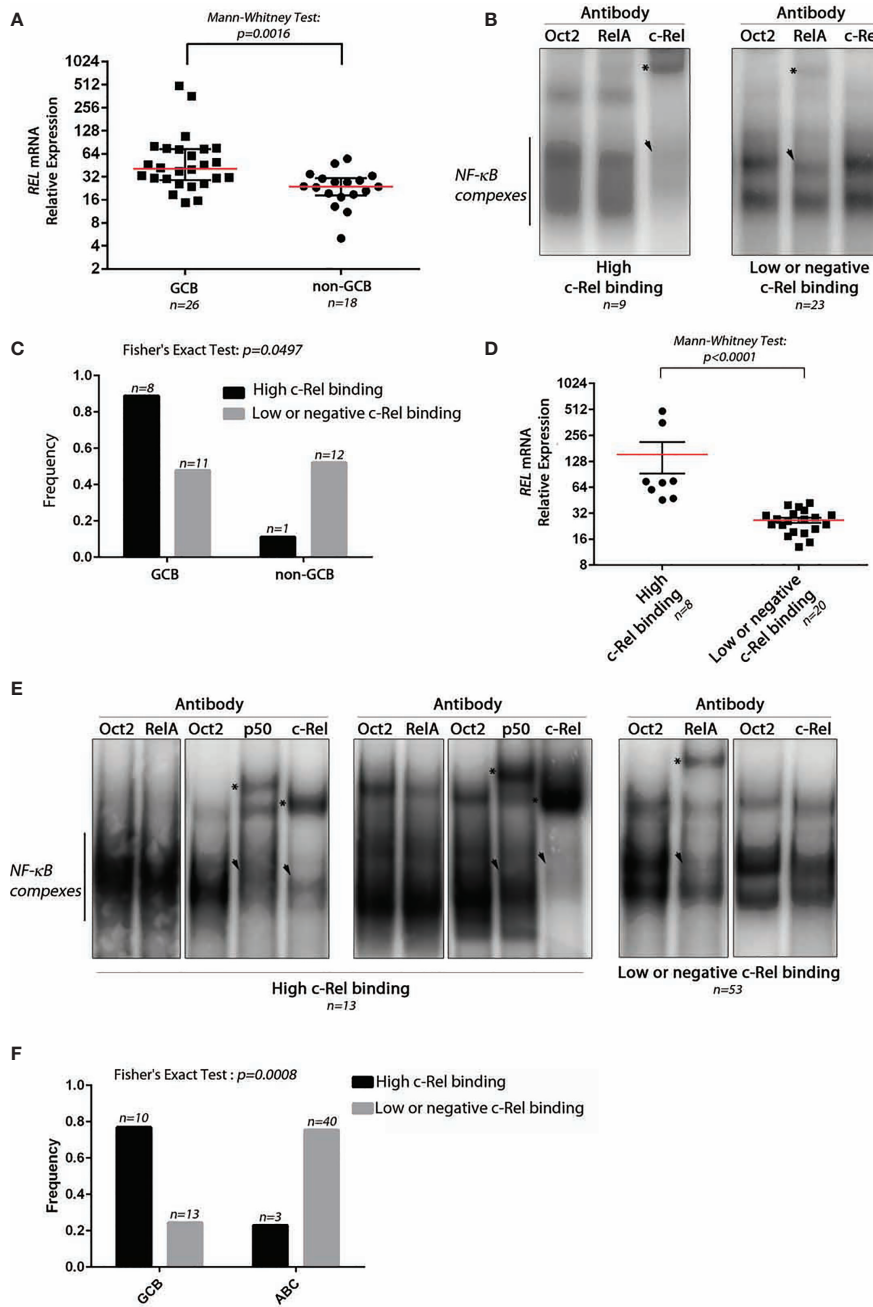


FIGURE 1 | Expression and DNA-binding activity of c-Rel in DLBCLs. **(A)** Relative expression level of *REL* mRNA using TaqMan quantitative PCR from 26 GCB-DLBCL and 18 non-GCB-DLBCL samples from a test series. The red line indicates the median with interquartile range. The approximate *p*-value of a Mann-Whitney test is indicated. **(B)** Two representative EMSAs showing NF- κ B complex DNA-binding on a κ B binding site containing probe from DLBCL cases with high c-Rel binding (left) and low or negative c-Rel binding (right). *n* indicates the number of cases with the same DNA-binding profile. The use of anti-RelA, anti-c-Rel, or anti-Oct2 (irrelevant control) antibodies is noted at the top. Asterisks point on the super-shifted EMSA signal. Arrowhead indicates decreased NF- κ B complex DNA-binding. **(C)** Frequencies of high c-Rel binding and low or negative c-Rel binding among GCB-DLBCLs and non-GCB-DLBCLs. **(D)** Relative expression levels of *REL* mRNA using TaqMan quantitative PCR from eight high c-Rel binding DLBCLs and 20 low or negative c-Rel binding DLBCLs. The red line indicates the median with interquartile range. The approximate *p*-value of a Mann-Whitney test is indicated. **(E)** DNA-binding activity of c-Rel from the training cohort of the GHEDI (Dubois) DLBCL series. EMSAs with supershift experiments (anti-Oct2, RelA, p50, or c-Rel antibodies) were done with proteins extracted from 66 frozen biopsies from 43 ABC-DLBCLs and 23 GCB-DLBCLs. Representative EMSAs showing NF- κ B complex DNA-binding on a κ B binding site containing probe from DLBCL cases with high c-Rel binding (left) and low or negative c-Rel binding (right). *n* indicates the number of cases with the same DNA-binding profile. Antibodies used for supershift are indicated at the top. Asterisks point on the super-shifted EMSA signal. Arrowhead indicates decreased NF- κ B complex DNA-binding. **(F)** Frequencies of high c-Rel binding and low or negative c-Rel binding among GCB-DLBCLs and ABC-DLBCLs.

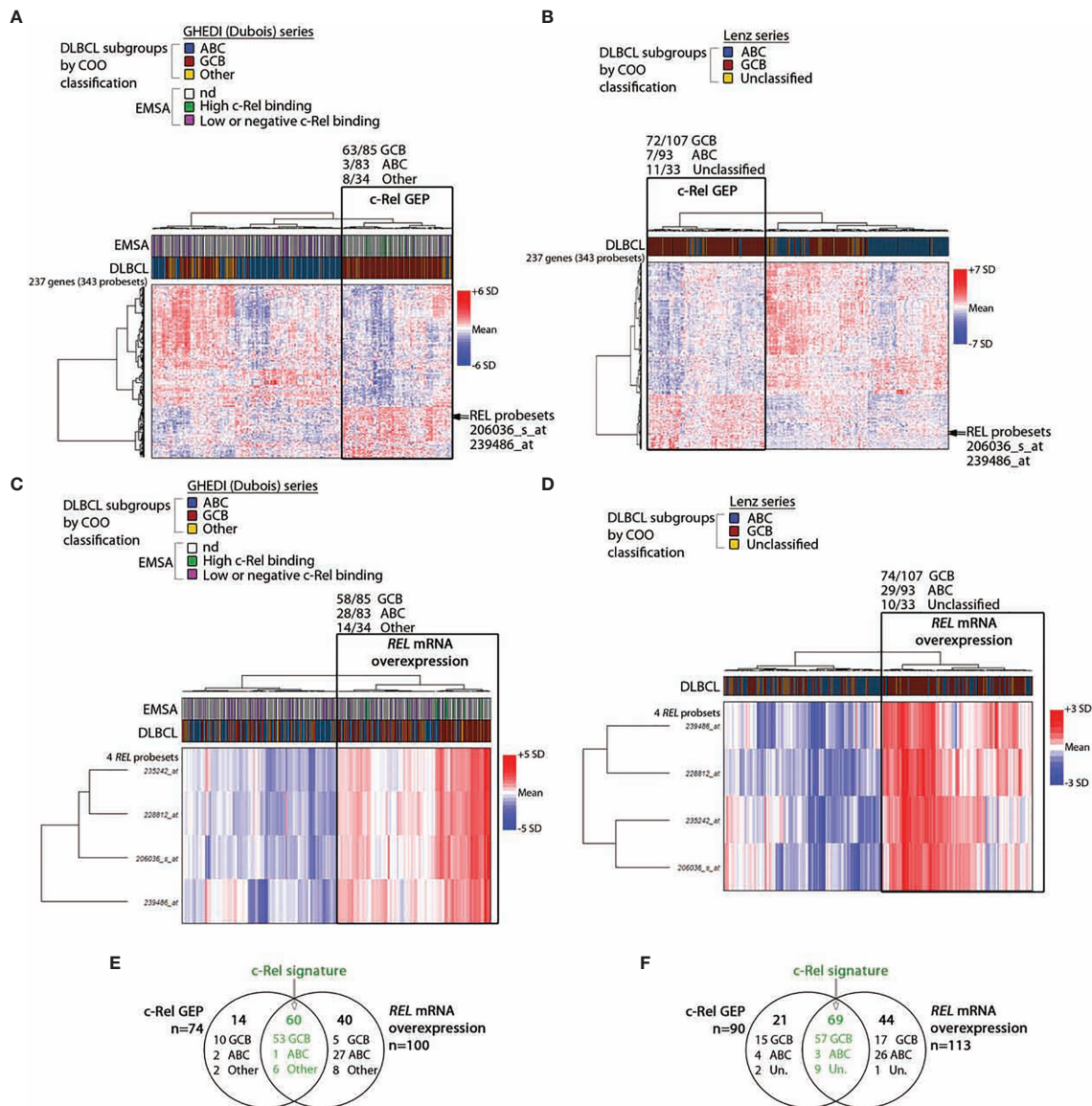


FIGURE 2 | c-Rel related transcriptomic signature of DLBCL patients. By comparing cases with high and low or negative c-Rel DNA-binding, a set of differentially expressed 343 probesets/237 genes with a fold change of two, and a p -value < 0.05 was selected after LIMMA analysis of 66 DLBCLs from the GHEDI cohort for which EMSAs with super-shift were performed. **(A, B)** Unsupervised hierarchical Ward clustering of the whole GHEDI cohort and the Lenz series respectively with the 343 selected probesets. Lines and columns of the heatmap correspond to probesets and patients respectively. Up- and down-regulated genes are color coded according to the color scale shown on the right of the heatmap. The blue, red, and yellow color codes above the heatmap give the original COO ABC/GCB/Other and the ABC/GC/Unclassified diagnosis of the GHEDI and Lenz series respectively. Position of the c-Rel probesets on gene clusters is indicated by an arrow. For the GHEDI series, high and low c-Rel binding cases by EMSA are color coded in green and purple respectively (nd: EMSA not done). The branch of patients with the c-Rel gene expression profile (c-Rel GEP) is highlighted by a black rectangle on each heatmap. Number of COO cases within this specific branch is indicated at the top of the black rectangle. **(C, D)** Unsupervised hierarchical Ward clustering of the entire GHEDI cohort and the Lenz series respectively with c-Rel probesets. Orientation of the heatmap and color codes are the same as in panel **(A)**. The branch of patients overexpressing *REL* mRNA is highlighted by a black rectangle on each heatmap. Number of COO cases within this specific branch is indicated at the top of the black rectangle. **(E, F)** Venn diagram showing the overlap of patients between c-Rel GEP and *REL* mRNA overexpression corresponding to c-Rel signature (in green). Number of cases in each group is indicated. Un., unclassified.

ABCs, and 11/33 (33%) Unclassified (χ^2 Test, $p < 10^{-6}$). Overlaps between genes from clustering of these two independent series were almost perfect, indicating the reproducibility of clustering between both series (**Supplementary Table S5**).

Among the up-regulated genes in GCB-DLBCLs with the c-Rel GEP was the *REL* gene. Restricting the analysis to the four *REL* probesets led to clusterize 100/202 (50%) cases of the GHEDI series, among them 58/85 (68%) GCBs, 28/83 (34%)

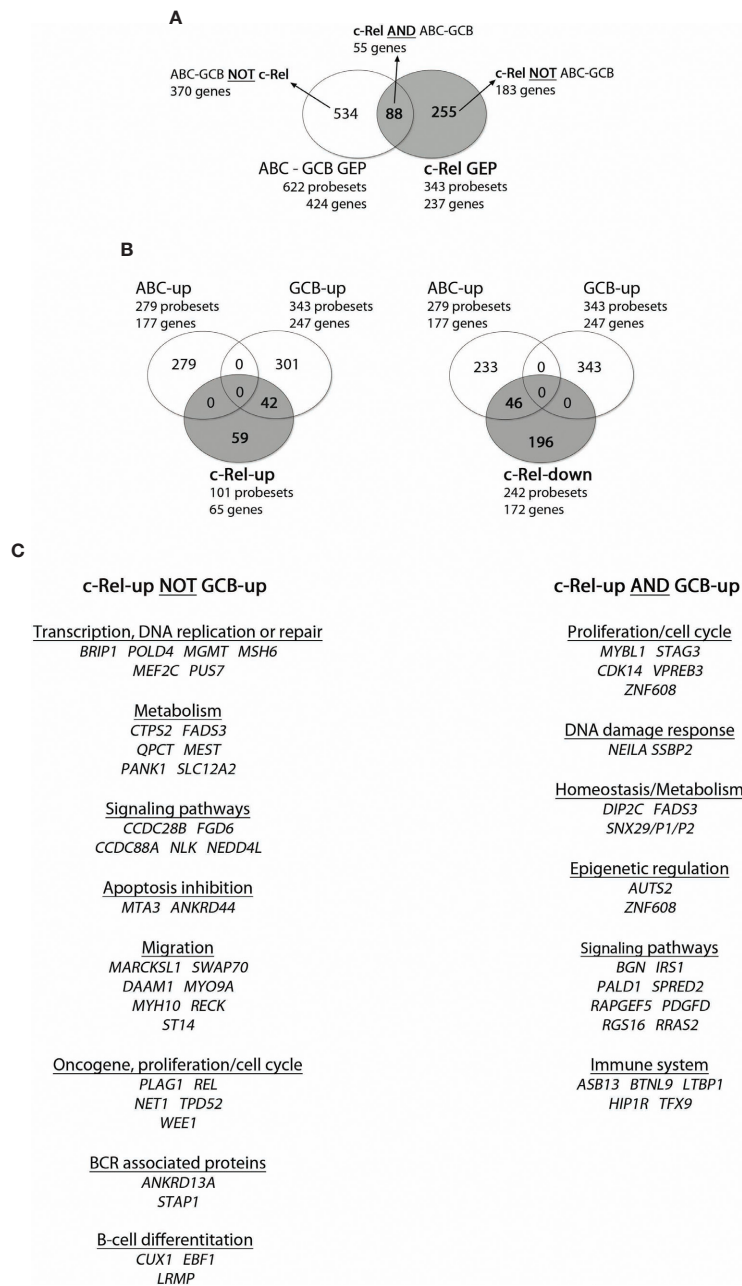


FIGURE 3 | Overlap between c-Rel and ABC-GCB gene expression profiles (GEPs). c-Rel GEP (237 genes, 65 up-regulated genes with 101 probesets, and 172 down-regulated genes with 242 probesets) and ABC-GCB GEP (424 genes, 177 up-regulated genes with 279 probesets, 247 down-regulated with 343 probesets) were established (fold change ≥ 2) from the 66 DLBCL cases of the GHEDI cohort for which the c-Rel DNA-binding profile was established. **(A)** Venn diagram showing overlaps of probesets and genes between c-Rel GEP and ABC-GCB GEP. Set of genes named “c-Rel AND ABC-GCB” corresponds to the intersection between c-Rel and ABC-GCB GEP with 55 genes and 88 probesets (list in **Supplementary Table S9**). “ABC-GCB NOT c-Rel” are genes found in ABC-GCB GEP but not in c-Rel GEP. “c-Rel NOT ABC-GCB” are genes differentially expressed in c-Rel GEP but not in ABC-GCB GEP. This nomenclature is used in **Figure 5**. **(B)** Venn diagrams showing overlap between c-Rel up-regulated genes (at left) or c-Rel down-regulated genes (at right) and ABC or GCB up genes. Indicated number corresponds to probesets that overlap or not. **(C)** c-Rel-up NOT GCB-up and c-Rel-up AND GCB-up gene lists. Genes are ordered related to their function.

ABCs, and 14/34 (41%) Others (**Figure 2C**, Chi² Test, $p = 2.5 \cdot 10^{-5}$). Similarly, clustering of the Lenz series with the REL probesets identified 113/233 (48%) cases with increased REL mRNA expression among them 74/107 (69%) GCBs, 29/93

(31%) ABCs, and 10/33 (30%) Unclassified (**Figure 2D**, Chi² test, $p = 4.5 \cdot 10^{-8}$). These cases were those with REL mRNA overexpression. This was in contrast with RELA or RELB because no association was established between mRNA

expression of these two NF- κ B subunits and the three COO subsets (not shown). To be stringent and because we have experimental evidence showing that over-expression of *REL* mRNA is associated with nuclear translocation of c-Rel protein with increased transcriptional activity (see below), we defined the c-Rel signature by both c-Rel GEP and *REL* mRNA overexpression. Among cases with the c-Rel signature, 53/60 (88%) and 57/69 (83%) were GCBs for the GHEDI and Lenz series respectively (Figures 2E, F).

Relationships Between c-Rel and ABC-GCB Gene Expression Profiles

In the next step, we investigated the relationship between c-Rel and ABC-GCB gene expression profiles (GEPs). On one hand, we first selected a set of 424 genes (622 probesets) that were differentially expressed with a two-fold change and an adjusted *p*-value below 0.05 between COO classified ABC and GCB-DLBCLs from the same series of 66 cases tested by EMSA. This “re-established” ABC-GCB GEP consisted of 177 (279 probesets) and 247 (343 probesets) up-regulated genes in ABC (ABC-up) and GCB (GCB-up) DLBCLs respectively (Supplementary Table S6). It included 18/44 (41%) genes of the ABC/GCB Wright’s predictor (2) such as *FOXP1*, *CCND2*, *IRF4*, *TCF4*, or *IL16* for ABCs and *LMO2*, *MYBL1*, or *VCL* for GCBs.

On the other hand and as mentioned above, the c-Rel GEP consisted of 237 genes: 65 up-regulated genes (101 probesets) and 172 down-regulated genes (242 probesets). The intersection between c-Rel and ABC-GCB GEP contained 55 genes (88 probesets) (Figure 3, and Supplementary Table S7). As shown in Figure 3, Venn diagrams indicate that c-Rel up-regulated genes overlapped partially, but only, with the GCB-up genes (26 genes; 42 probesets). Oppositely, c-Rel down-regulated genes overlapped only with ABC-up genes (28 genes; 46 probesets).

This analysis shows that c-Rel GEP only overlapped with GCB GEP, a very strong indication that c-Rel is linked to GCBs and not to ABCs. It also shows that the c-Rel GEP, including *REL* itself, was mainly based on an original set of genes.

Association of the c-Rel Signature With Genomic Alterations Related to GCB-DLBCLs

The c-Rel signature was associated with increased frequencies of *REL* locus gains (Figure 4A, Fisher’s Exact Test, $p = 10^{-4}$). Consistently, cases with *REL* gains had higher levels of *REL* mRNA (Figure 4B). Frequencies of *BCL2* gene translocation were increased in cases with the c-Rel signature (Figure 3C, Fisher’s Exact Test, $p = 1.2 \cdot 10^{-6}$). Conversely, *BCL6* translocation was associated with cases with the non-c-Rel signature, while *MYC* translocation was equally rare in both cases (Figure 4C, Fisher’s Exact Test, $p = 0.023$ and $p = 0.24$ respectively).

Mutational status of 34 genes recurrently altered in DLBCLs was explored in 183/202 cases from the GHEDI cohort, including 59/66 (89%) cases for which c-Rel DNA-binding activity was assessed. As shown in Figures 5A, B, mutational profiles of cases

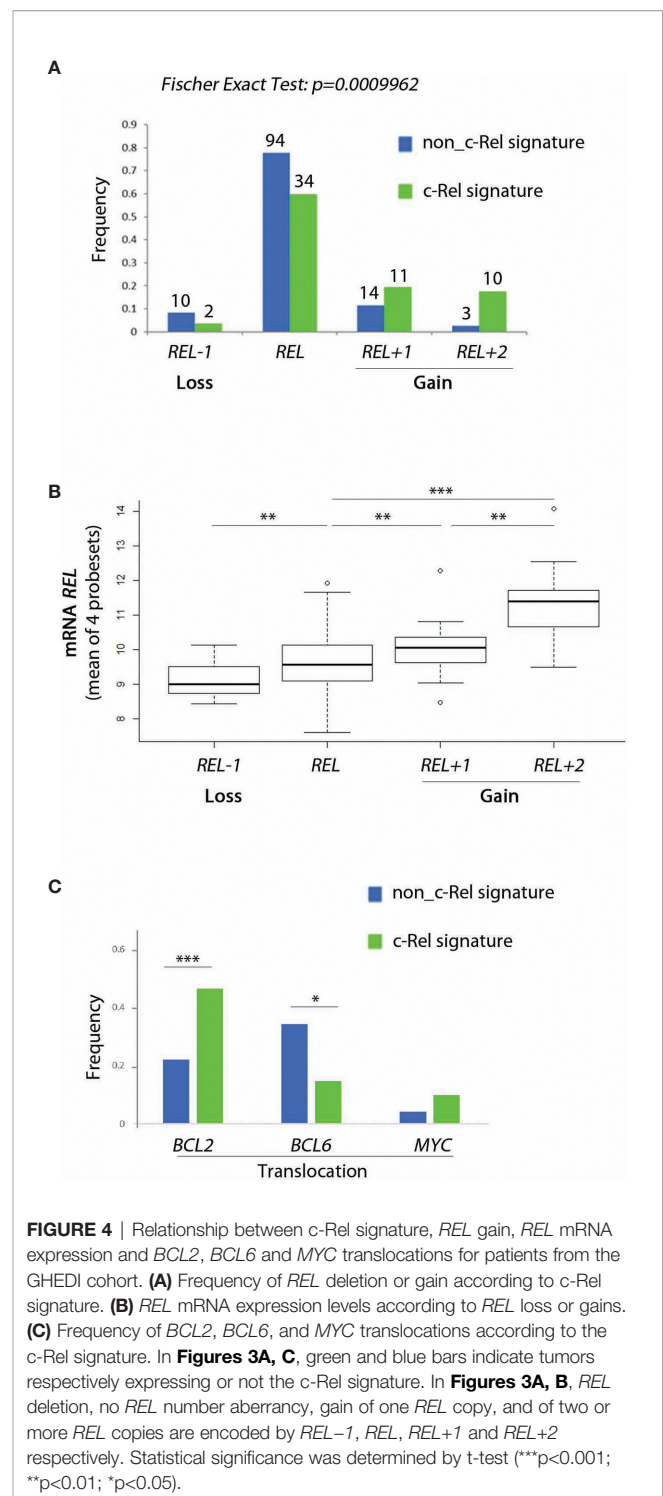
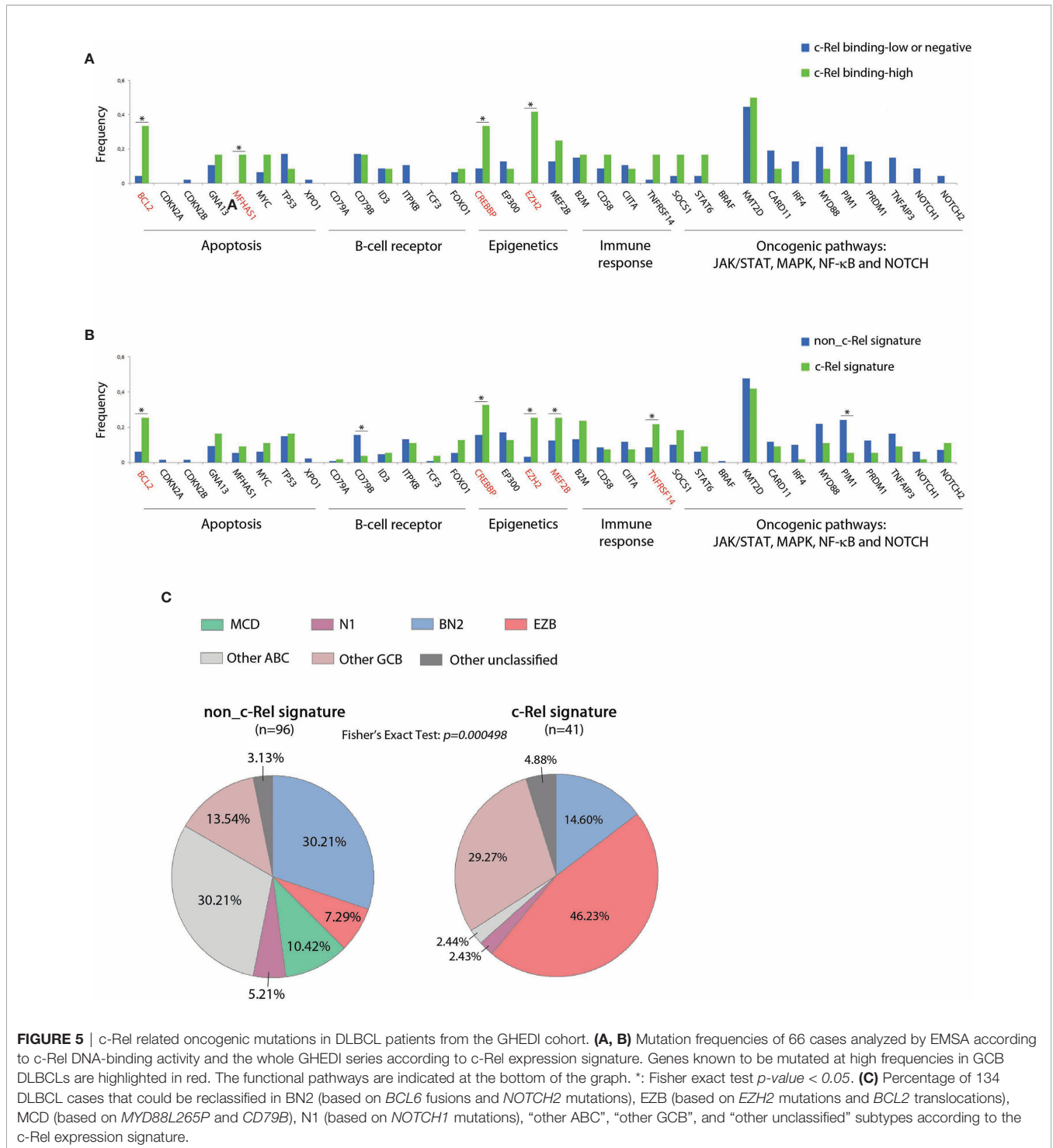


FIGURE 4 | Relationship between c-Rel signature, *REL* gain, *REL* mRNA expression and *BCL2*, *BCL6* and *MYC* translocations for patients from the GHEDI cohort. (A) Frequency of *REL* deletion or gain according to c-Rel signature. (B) *REL* mRNA expression levels according to *REL* loss or gains. (C) Frequency of *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* translocations according to the c-Rel signature. In Figures 3A, C, green and blue bars indicate tumors respectively expressing or not the c-Rel signature. In Figures 3A, B, *REL* deletion, no *REL* number aberrancy, gain of one *REL* copy, and of two or more *REL* copies are encoded by *REL-1*, *REL*, *REL+1* and *REL+2* respectively. Statistical significance was determined by t-test (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

with high c-Rel DNA-binding or with the c-Rel signature were closed, being characterized by increased frequencies of *BCL2*, *CREBBP*, *EZH2*, *MEF2B*, and *TNFRSF14* mutations and decreased frequency of *CD79B* and *PIM1* mutations when compared to cases with the non-c-Rel signature. FISH cytogenetics and mutational status of *MYD88*, *CD79B*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *BCL2*, and *EZH2* classified 137/202 (67%)



DLBCL cases from the GHEDI cohort according to genetic subtypes defined by Schmitz et al. (5). We found 35 BN2 (based on *BCL6* fusions and *NOTCH2* mutations), 26 EZB (based on *EZH2* mutations and *BCL2* translocations), 10 MCD (based on the co-occurrence of *MYD88L265P* and *CD79B* mutations), six N1 (based on *NOTCH1* mutations), 30 “other ABC”, 25 “other GCB”, and five “other unclassified” cases

(**Supplementary Table S8**). As shown in **Figure 5C**, the c-Rel signature was mostly associated with the GCB EZB subtype, while this signature was absent in MCD cases and almost absent from the “other ABC” subtype. Of note, survival analysis indicated that, even if numbers were small, c-Rel signature tended to be associated with good prognosis among EZB cases (**Supplementary Figure S3**).

Thus, the c-Rel signature was related to *REL* locus gains and to other mutations known to be associated with GCB-DLBCL cases such as *BCL2* translocation and *EZH2* mutations. Consequently, the c-Rel signature subtype was part of the EZB DLBCL subtype and had a favorable impact on patient survival.

The c-Rel Signature Is Associated With Decreased Genomic Complexity, Specific Gene Imbalances and Better Overall Survival

We next analyzed the whole genome imbalances of the GHEDI series by CGH-array. With the GISTIC pipeline, each of the 23,636 gene loci was scored between -2, -1, 0, 1, 2 according to the level of gene loss (-2 meaning loss of both alleles and +2 meaning gain of two copies or more). Because of the uncertainties of CGH-array signal quantification, only gene scores of -2 or +2 were taken into account. With these criteria, the genomic imbalance complexity was estimated as the number of all genes for which loci were deleted or amplified. Histogram frequencies of the number of gene loci imbalances revealed a bimodal distribution with a threshold at 1,000 (Figure 6A). The proportion of cases with a genomic imbalance complexity over this threshold was increased in ABC-DLBCLs when compared to GCB or "Other" DLBCLs but without reaching statistical significance (Figure 6B). By contrast, the c-Rel signature was associated with a marked decrease in cases with a genomic imbalance complexity above 1,000 (Figure 6B, Wilcoxon test, $p = 0.017$). This was still true and even more striking when this analysis was restricted to GCB cases only (Figure 6B, Wilcoxon test, $p = 0.003$). Indeed while being not significantly different between ABC and GCB-DLBCLs, the genomic imbalance complexity of cases with the c-Rel signature was significantly decreased when compared to non-c-Rel cases (Figures 6C, D).

To search for specifically altered gene loci in c-Rel cases, we used as a criterion that a gene copy number aberration had to be retrieved in at least 10% of c-Rel cases with a 50% frequency increase when compared to non-c-Rel cases. With this condition a list of 24 genes was selected (Figure 6E and Supplementary Table S9). All these genes, including *REL*, were located in the 2p15-16.1 chromosome region when amplified and in the 22q11.22 chromosome region when deleted (Supplementary Table S9). Amplification of 2p15-16.1 chromosome region could be expected (24) and is associated with transformation from follicular lymphoma to DLBCL (25). Deletion of the 22q region was reported once and could be associated in DLBCLs with a more advanced clinical stage (26). Among these genes, some are already known in DLBCLs. For example, we found that *USP34* (*Ubiquitin Specific Peptidase 34*) and *BCL11A* (*BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit BCL11A*) were co-amplified with *REL* itself. Co-amplification of these three gene loci is found in transformed DLBCLs and indicates a gain of chromosome 2p15-16.1 (25). Amplification of the *XPO1* gene (*Exportin 1*, also located on chromosome 2p15) was found in 10.5% c-Rel cases of the GHEDI series. *XPO1* gene mutations have been associated with PMBLs (22). High *XPO1* expression has been reported in DLBCL and its specific inhibition is

targetable by the selinexor agent (27). *PRAME* (*Preferentially Expressed Antigen In Melanoma*, located in 22q11.22) gene, which overexpression is associated with a worse prognosis in DLBCLs (28), was deleted in 12.3% c-Rel cases, suggesting these cases were oppositely associated with expression of this gene. Deletion of *IGLL5* (*Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide 5*, also located in 22q11.22) locus, which is one of the most mutated gene in DLBCLs, was found in 17.5% c-Rel cases.

Since genomic imbalance complexity was decreased in DLBCL cases with the c-Rel signature and that these cases exhibited specific gene copy number aberrations that could be associated with prognostic, we examined the overall survival (OS) impact of the c-Rel signature. DLBCL cases from both GHEDI and Lenz series with the c-Rel signature exhibited an increased overall survival (OS) (upper panel of Figures 6F, G). Interestingly, and most likely related to the lower genomic imbalance burden, this better OS tended to be confirmed on GCB cases (lower panel of Figures 6F, G).

Overexpression of c-Rel Was Associated With Increased Protection Against Apoptosis

To assess the *in vitro* functional role of c-Rel on proliferation and protection against apoptosis, we used the cell cycle arrested EREB2.5 cell line. This cell line, which proliferation can be arrested by estradiol withdrawal, allows assaying the role of any putative oncogene without interference with its proliferation potential. Cells were stably transfected with a doxycycline regulatable episomal vector allowing for expression of c-Rel. In B-cells, c-Rel is regulated by $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ inhibitors with a predominant role of the latter (29). In consequence and in addition to the luciferase control, we also transfected cells to over-express the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha_{S32,36A}$ super-repressor (20) and the $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ inhibitor. As shown in Figure 7A, c-Rel overexpression in estradiol starved EREB2.5 B-cells (resting state) was associated with increased expression of RelB, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, TRAF1, and A20 proteins (known to be NF- κB targets) when compared to luciferase-expressing cells, suggesting a constitutive NF- κB transcriptional activity. Indeed, c-Rel was constitutively found in the nucleus of cells when over-expressed (Figure 7B). No effect of c-Rel was seen on cell proliferation in this model (not shown). While induction of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ inhibitors increased cell apoptosis, c-Rel protected resting EREB2.5 B-cells against cell death when compared to luciferase control cells (Figure 7C). Reciprocally, inhibition of c-Rel expression in the GCB SUDHL-4 cell line tended to increase cell death (Supplementary Figure S4).

Therefore, overexpression of c-Rel was associated with its constitutive nuclear translocation, and protection against cell death.

DISCUSSION

Here, we describe a new c-Rel transcriptomic signature related to c-Rel DNA-binding activity in GCB-DLBCLs. Results indicate that this new c-Rel signature defined a good prognosis compared to non-c-Rel cases. Cases with the c-Rel signature were more

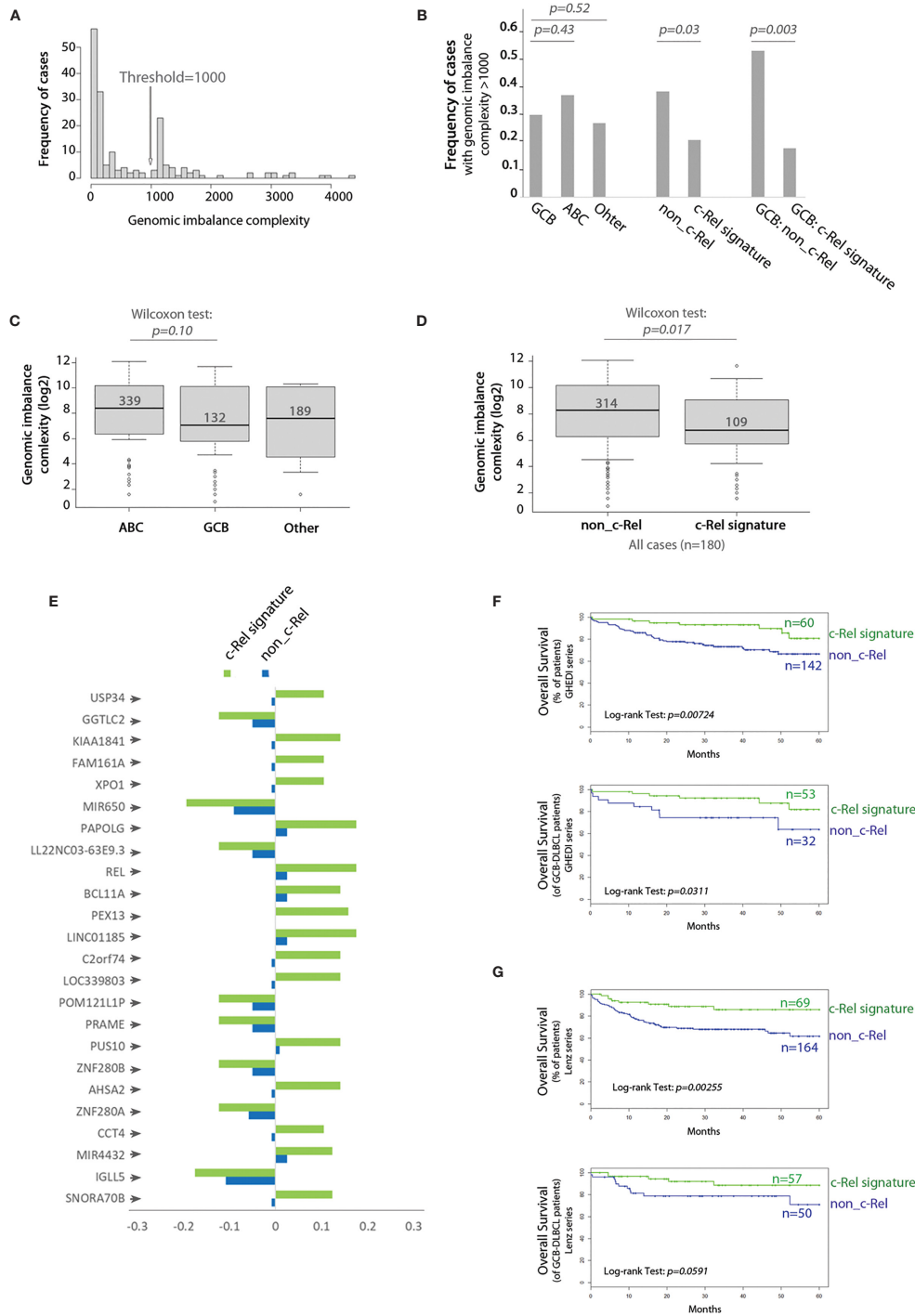


FIGURE 6 | c-Rel related gene copy number aberrations and overall survival. **(A)** Frequency histogram of the genomic imbalance burden reveals a bimodal distribution with a threshold at 1,000. **(B)** Frequency of DBCL cases with a genomic imbalance burden >1,000 according to the COO classification (left), absence (non_c-Rel) or presence (c-Rel signature) of the c-Rel signature (middle and right) among the entire GHEDI series (left and middle) or GCB-DLBCLs only (right). Chi² test p-values are indicated on the top. **(C)** Boxplot of the genomic imbalance burden according to the COO classification. **(D)** Boxplot of the genomic imbalance burden according to the absence (non_c-Rel) or presence (c-Rel signature) of the c-Rel signature. **(C, D)** Median number of gene imbalances is indicated by the black solid line. Wilcoxon test p-values are shown on the top. **(E)** Frequency of cases with gene copy number aberrations for the 24 gene loci specifically imbalanced in DLBCL cases with the c-Rel signature. Negative values mean deletion while positive values mean amplification. **(F, G)** Kaplan–Meier overall survival curves of all (upper panel) or GCB (lower panel) patients from GHEDI and Lenz series respectively according to expression of the c-Rel signature (c-Rel signature, green curve) or not (non_c-Rel, blue curve). Number of cases is indicated on the right. The log-rank p-value is given within each graph.

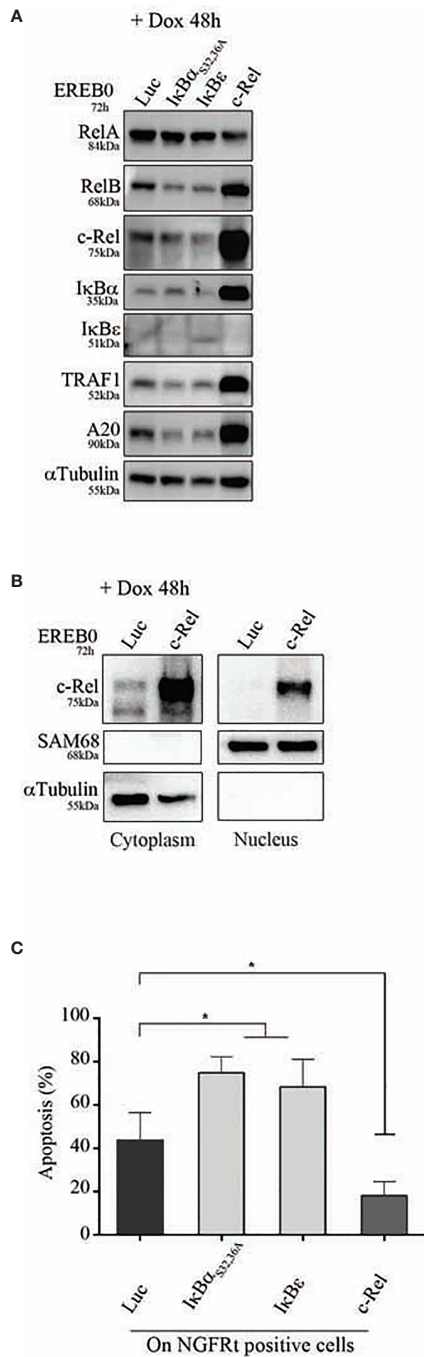


FIGURE 7 | Apoptosis of c-Rel overexpressed human B-cells. EREB2-5 cells were stably transfected with the doxycycline-regulatable pRT-1 vector coding for Luciferase (Luc), IκB_{S32,36A}, IκBε, or c-Rel. After estradiol starvation for 24 h (EREBO), cells were treated with doxycycline (+ Dox) for 48 h. **(A)** Immunoblots detecting the expression of RelA, RelB, c-Rel, IκBα, IκBε, TRAF1, A20 as well as αTubulin as loading control. **(B)** Detection of cytoplasmic and nuclear c-Rel protein by immunoblot. SAM68 and αTubulin revelations are nuclear and cytoplasmic markers, respectively. **(C)** Percentages of Annexin-V-positive cells gated on NGFRt positive cells. Statistically significant difference (Mann-Whitney test) is indicated by * ($p \leq 0.05$).

frequently associated with *REL* locus gains, *BCL2* translocation, and *EZH2* mutations. Functionally, overexpression of c-Rel protein was sufficient to induce its nuclear translocation and to protect cells against apoptosis.

The relationship between *REL* gains and *REL* mRNA overexpression has been previously reported by others (8). Confirming those published by Li et al. (30), our results show that *REL* mRNA levels were higher in GCB than in ABC-DLBCLs. Probably due to immunostaining technical limitations, it is not clear from the literature whether a clear relationship between c-Rel protein expression levels, its nuclear localization and *REL* amplification exists in ABC and GCB-DLBCLs (30, 31). Pham et al. reported significant higher c-Rel DNA-binding activity in GCB compared to ABC-DLBCL subtypes from 14 DLBCL cell lines and 14 DLBCL patient samples using an ELISA-based approach (32). By EMSA with a supershift approach, we show that high c-Rel DNA-binding was more frequently associated with GCB than ABC-DLBCLs in two independent DLBCL series. We also found that *REL* mRNA expression levels were correlated to its c-Rel DNA-binding activity, to c-Rel GEP, and to *REL* amplification. This suggests that *REL* mRNA overexpression is probably a good indicator of c-Rel transcriptional activity. This conducted us to define the c-Rel signature as the association of both *REL* mRNA overexpression and c-Rel GEP. These DLBCL cases were those with the best overall survival in both the GHEDI and Lenz series.

The c-Rel GEP consisted in 237 differentially expressed genes between high c-Rel binding samples and the others. Among up-regulated genes of the c-Rel GEP were *REL* and *NLK* (*Nemo-Like Kinase*). *NLK* has been shown to negatively regulate RelA NF-κB activation by targeting CBP300 or IKKβ (33). Increased expression of *NLK* has been found in various solid cancers such as those of the colon or lung (34). The c-Rel GEP also includes *EBF1* or *SWAP70* genes. *EBF1* coding for a B-cell specific transcription factor is involved in immunoglobulin heavy chain translocations in DLBCLs (35), and *SWAP70* is known to be associated with B-cell activation, immunoglobulin class switching, migration and homing processes essential for B-cell entry into lymph nodes, and germinal center formation (36). Genes involved in metabolism such as pyrimidine nucleotide or lipid metabolic processes with *CTPS2* (*CTP synthesis from UTP*) and *FADS3* (*fatty acid desaturase 3*) genes were also among the up-regulated genes of the c-Rel GEP. Some of the c-Rel-up and GCB-up subset of genes are involved in cell proliferation, G2/M transition of the mitotic cell cycle, or in DNA repair such as *STAG3*, *CDK14*, and *NEIL1*. Other genes are also regulators of the Ras signaling pathway such as *RAPGEF5*, *RGS16*, and *RRAS2* genes. NF-κB activity in cancer can arise from mutations in upstream regulators such as the Ras pathway (37). Oncogenic *KRAS* driven cancers require NF-κB anti-apoptotic signals involving c-Rel (38). Furthermore, microRNA dysregulation can target the Ras signaling pathway in germinal center derived lymphomas such as DLBCLs and Burkitt's lymphomas (39). The *VPREB3* gene, also belonging to this gene subset, has been shown to be over-expressed in germinal center B-cells as well as in DLBCLs with *MYC* amplification (40). Consistent with

the previously described importance of c-Rel in germinal center B-cells, various genes that are in the c-Rel-down and ABC-up subset are known to be down-regulated in the germinal center B-cells such as *BATF*, *RAB29*, *CCND2*, *HCK*, *CD44*, and *STAT3*.

Interestingly, cases from the GHEDI series with high c-Rel DNA-binding and c-Rel signature more frequently exhibited the genetic events previously ascribed to GCB-DLBCLs and follicular lymphomas (FL) (1), including *BCL2* translocation, *MEF2B* and *EZH2* gain of function mutations as well as loss of function of the tumor suppressors *CREBBP*, and *TNFRSF14*. *MEF2B* may control *BCL6* which in turn regulates *LMO2* and *MYBL1* (41), the latter being up-regulated in both GCB and c-Rel signatures. As demonstrated by LM Staudt's group, the ABC/GCB-DLBCL subgroups can be separated into distinct genetic subtypes, among them EZB, based on *EZH2* mutations and *BCL2* translocation. This subtype mainly corresponds to the GCB-DLBCL cases (5). EZB is also related to *REL* amplification (5). Here, EZB DLBCLs frequently exhibited the c-Rel signature that could suggest a relationship between c-Rel transcriptomic activity and *EZH2* dysregulation. This could probably, at least partially, be due to the transcriptional regulation of *EZH2* by c-Rel as previously shown in activated B and T lymphocytes (42). Patients with EZB tumors have a trend toward increased frequency of *MYC* translocation and inferior overall survival when compared to "other GCB" patients (5, 43). The number of cases from the GHEDI series with *MYC* translocation was too low to draw any conclusions. Nevertheless, among all GCB as well as the EZB classified GCB cases, patients with the c-Rel signature had a much more favorable outcome than non-c-Rel patients. This probably illustrates the importance of c-Rel in the biology of GCB cases.

Under normal conditions, c-Rel is expressed in mature B-cells. Its expression is up-regulated throughout B-cell differentiation upon activation mediated by the B-cell receptor (BCR), and CD40 during T-cell contact. Toll-like receptors 4 and 9 also mediate c-Rel expression in B-cells (44). Germinal center formation and maintenance require c-Rel expression in order for B-cells to shuttle between dark and light zones (45). Furthermore, BCR activated B-cells have elevated levels of apoptosis in the absence of c-Rel (46) suggesting that c-Rel provides an important survival signal to reconfigure the BCR in germinal centers. In pathological conditions, we speculate that aberrant increased c-Rel expression and/or activity corresponding to the c-Rel signature may promote tumorigenesis in DLBCL-precursor cells by disturbing the normal dynamics of germinal center B-cell development. In other words, c-Rel could send a survival signal to a germinal center B-cell normally destined to die (after, for example, loss of antigen recognition ability). Like NF- κ B continuous activation in MALT lymphoma that is first due to the B-cell immune environment before acquiring its independence thanks to translocations involving *MALT1* and *BCL10* genes, it can be hypothesized that the germinal center environment of the initial tumor cell was first responsible for the c-Rel up-regulation. c-Rel up-regulation would become constitutive over time thanks to acquired genetic events such as *REL* amplification for example or by others not known yet mechanisms including epigenetic,

transcriptomic, and/or post-transcriptional oncogenic events. As mentioned above, the dysregulation of the RAS pathway, that we found associated with the c-Rel signature, could be one of this additional oncogenic mechanisms (38). Finally, our *in vitro* results suggest that *REL* mRNA overexpression is associated with nuclear translocation of a transcriptionally active c-Rel protein in the absence of any activation signal, and increased protection against apoptosis in a model of resting human B-cells. We previously showed that overexpressed RelA remains stored in the cytoplasm in the absence of adequate activation signals in the EREB2.5 EBV transformed B-cell model [(20) and unpublished results]. In contrast to RelA, c-Rel does not have a nuclear export signal explaining why *de novo* c-Rel gene transcription and translation can lead to long-term maintenance of nuclear c-Rel-containing heterodimers (47). These different properties of the NF- κ B subunits would explain why tumors dependent upon RelA activation must absolutely acquire mutations in the NF- κ B activation track while c-Rel overexpression, due for example to *REL* locus gains, would not require additional activation events to achieve c-Rel effects.

The hypothesis that, to exert its oncogenic effects, c-Rel would not need additional genetic events is fully in agreement with the fact that the genomic imbalance complexity of DLBCL cases with the c-Rel signature was markedly decreased. It has been shown that, rather than the antigenic pressure, oncogenic events are the main driving forces for relapse in DLBCLs (48). Like in chronic lymphocytic leukemia in which the cytogenetic complexity is associated with resistance to therapies, increased imbalance genomic complexity in non-c-Rel cases is very likely to be related to genetic instability that would favor the selection of a therapy resistant DLBCL subclone. Oppositely around, the decreased genomic imbalance complexity of c-Rel DLBCL cases would be associated with a better prognosis.

While ABC-DLBCLs are very likely to be associated with RelA activation, the place of c-Rel in DLBCLs remains rather enigmatic since it is associated with GCB-DLBCLs that are not supposed to harbor any NF- κ B activity. An explanation for such a discrepancy between the absence of NF- κ B signature and *REL* amplification may have been provided by TJ de Jesús and P Ramakrishnan (49). Indeed these authors showed that c-Rel represses TNF- α -induced RelA-mediated transcription. This suggests that long term over-expression of c-Rel could extinguish the RelA signature. In that context, a c-Rel signature would almost never overlap with that of RelA. Consistently, we did not find any overlap in between c-Rel and ABC-DLBCL signatures.

For the first time, we show that a strong c-Rel DNA binding activity was a feature of GCB-DLBCLs. These GCBs specifically exhibited a c-Rel transcriptomic signature, *REL* gains, *BCL2* translocation, *EZH2* mutations, and a favorable prognosis. They also exhibited a decreased genomic imbalance burden and some specific gene copy aberrations that are linked to 2p15-16.1 amplification and 22q11.22 deletion. These could likely be associated with the outcome such as *PRAME* deletion or *XPO1* amplification, the latter being also targetable by selinexor. Functionally, c-Rel was responsible for protection

against apoptosis. Thus, c-Rel could very likely participate in cell transformation in a significant proportion of GCB-DLBCLs. As a future direction, the better survival advantage for DLBCL patients with a c-Rel signature could be examined with regard to both sensitivity toward apoptosis under classical therapeutic molecules and the ability of tumor cells to be eliminated by the immune microenvironment. Even if this has to be confirmed on prospective studies, R-CHOP regimen is likely to give very good results on DLBCL tumors with the c-Rel signature. This also raises the question whether the c-Rel signature could become a decision criterion to better choose patients who would very likely be able to benefit from R-CHOP regimen or not. In other words, it would be of importance to find alternative therapeutics for patients whose DLBCL tumors do not exhibit the c-Rel signature and have increased genomic imbalance complexity.

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 in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the LYSA group Institutional Review Board. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NF, VB, and JF designed the study and supervised the work. NF and JF wrote the manuscript. NF, OT, DC, and LP made the experiments. KL, JF, and TM reviewed and selected the cases from the GHEDI series of patients. NF, JF, BP, M-PG, DB, and DT reviewed and selected the cases issued from the CHU of

Limoges. JF and J-PJ made the bioinformatics and the statistics. CC-B made the cytogenetics. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by grants from the Institut National du Cancer (INCA). The group of JF is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC) and the Haute-Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer. The group of VB is supported by grants from the Institut National du Cancer, Agence Nationale pour la Recherche, the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 766214, Université de Paris, and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (Equipe labellisée), and doctoral funding from IDEX doctoral international program and Société Française d'Hématologie (to DC).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A Olivierie and A David, Regional Reference Structure of Limousin Lymphomas, Clinical Hematology Department, CHU of Limoges, France, for their helpful assistance in clinical data handling. We thank C Ouk from BISCEM US 42 INSERM/UMS 2015 CNRS platforms for flow cytometry analysis. We thank Dr J Cook Moreau, UMR CNRS 7276/INSERM 1262, Limoges, France, for English editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.638897/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:565–610. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075027
- 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) 100:9991–6. doi: 10.1073/pnas.1732008100
- Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2015) 33:2848–56. doi: 10.1200/JCO.2014.60.2383
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* (2001) 194:1861–74. doi: 10.1084/jem.194.12.1861
- Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2018) 378:1396–407. doi: 10.1056/NEJMoa1801445
- Deffenbacher KE, Iqbal J, Sanger W, Shen Y, Lachel C, Liu Z, et al. Molecular distinctions between pediatric and adult mature B-cell non-Hodgkin lymphomas identified through genomic profiling. *Blood* (2012) 119:3757–66. doi: 10.1182/blood-2011-05-349662
- Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* (2004) 165:159–66. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63284-1
- Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, Parmentier F, Picquenot J-M, Ruminy P, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* (2010) 116:1092–104. doi: 10.1182/blood-2009-10-247122
- Brownell E, O'Brien SJ, Nash WG, Rice N. Genetic characterization of human c-rel sequences. *Mol Cell Biol* (1985) 5:2826–31. doi: 10.1128/mcb.5.10.2826

10. Gilmore TD, Cormier C, Jean-Jacques J, Gapuzan ME. Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene* (2001) 20:7098–103. doi: 10.1038/sj.onc.1204898
11. Fan Y, Gélinas C. An optimal range of transcription potency is necessary for efficient cell transformation by c-Rel to ensure optimal nuclear localization and gene-specific activation. *Oncogene* (2007) 26:4038–43. doi: 10.1038/sj.onc.1210164
12. Liou H-C. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J Biochem Mol Biol* (2002) 35:537–46. doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.6.537
13. Roy K, Mitchell S, Liu Y, Ohta S, Lin Y-S, Metzger MO, et al. Hoffmann A. A Regulatory Circuit Controlling the Dynamics of NFκB cRel Transitions B Cells from Proliferation to Plasma Cell Differentiation. *Immunity* (2019) 50:616–28.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.004
14. Köntgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* (1995) 9:1965–77. doi: 10.1101/gad.9.16.1965
15. Tian W, Liou H-C. RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo. *PLoS One* (2009) 4:e5028. doi: 10.1371/journal.pone.0005028
16. Kober-Hasslacher M, Oh-Strauß H, Kumar D, Soberón V, Diehl C, Lech M, et al. c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *J Clin Invest* (2020) 130:3270–86. doi: 10.1172/JCI124382
17. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* (2016) 127:2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
18. Chauzeix J, Pastoret C, Donaty L, Gachard N, Fest T, Feuillaud J, et al. A reduced panel of eight genes (ATM, SF3B1, NOTCH1, BIRC3, XPO1, MYD88, TNFAIP3, and TP53) as an estimator of the tumor mutational burden in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* (2020). doi: 10.1111/ijlh.13435
19. Dubois S, Tesson B, Mareschal S, Vially P-J, Bohers E, Ruminy P, et al. Refining diffuse large B-cell lymphoma subgroups using integrated analysis of molecular profiles. *EBioMedicine* (2019) 48:58–69. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.09.034
20. 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* (2013) 28:871–9. doi: 10.1038/leu.2013.274
21. Kempkes B, Zimmer-Strobl U, Eissner G, Pawlita M, Falk M, Hammerschmidt W, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol* (1996) 77 (Pt 2):227–37. doi: 10.1099/0022-1317-77-2-227
22. Dubois S, Vially P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2016) 22:2919–28. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305
23. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:13520–5. doi: 10.1073/pnas.0804295105
24. Kober-Hasslacher M, Schmidt-Supprian M. The Unsolved Puzzle of c-Rel in B Cell Lymphoma. *Cancers* (2019) 11:941–66. doi: 10.3390/cancers11070941
25. Kwicinska A, Ichimura K, Berglund M, Dinets A, Sulaiman L, Collins VP, et al. Amplification of 2p as a genomic marker for transformation in lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* (2014) 53:750–68. doi: 10.1002/gcc.22184
26. Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui W-O, Backlin C, Thunberg U, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* (2002) 15:807–16. doi: 10.1097/01.MP.0000024375.04135.2B
27. Deng M, Zhang M, Xu-Monette ZY, Pham LV, Tzankov A, Visco C, et al. XPO1 expression worsens the prognosis of unfavorable DLBCL that can be effectively targeted by selinexor in the absence of mutant p53. *J Hematol Oncol Hematol Oncol* (2020) 13:148. doi: 10.1186/s13045-020-00982-3
28. Mitsuhashi K, Masuda A, Wang Y-H, Shiseki M, Motoji T. Prognostic significance of PRAME expression based on immunohistochemistry for diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP therapy. *Int J Hematol* (2014) 100:88–95. doi: 10.1007/s12185-014-1593-z
29. Clark JM, Aleksiyadis K, Martin A, McNamee K, Tharmalingam T, Williams RO, et al. Inhibitor of kappa B epsilon (IkBe) is a non-redundant regulator of c-Rel-dependent gene expression in murine T and B cells. *PLoS One* (2011) 6: e24504. doi: 10.1371/journal.pone.0024504
30. Li L, Xu-Monette ZY, Ok CY, Tzankov A, Manyam GC, Sun R, et al. Prognostic impact of c-Rel nuclear expression and REL amplification and crosstalk between c-Rel and the p53 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* (2015) 6:23157–80. doi: 10.18632/oncotarget.4319
31. Odqvist L, Montes-Moreno S, Sánchez-Pacheco RE, Young KH, Martín-Sánchez E, Cereceda L, et al. NFκB expression is a feature of both activated B-cell-like and germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* (2014) 27:1331–7. doi: 10.1038/modpathol.2014.34
32. Pham LV, Fu L, Tamayo AT, Bueso-Ramos C, Drakos E, Vega F, et al. Constitutive BR3 receptor signaling in diffuse, large B-cell lymphomas stabilizes nuclear factor-κB-inducing kinase while activating both canonical and alternative nuclear factor-κB pathways. *Blood* (2011) 117:200–10. doi: 10.1182/blood-2010-06-290437
33. Li S-Z, Zhang H-H, Liang J-B, Song Y, Jin B-X, Xing N-N, et al. Nemo-like kinase (NLK) negatively regulates NF-kappa B activity through disrupting the interaction of TAK1 with IKKβ. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1843:1365–72. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.028
34. Lei L, Wang Y, Zheng Y-W, Fei L-R, Shen H-Y, Li Z-H, et al. Overexpression of Nemo-like Kinase Promotes the Proliferation and Invasion of Lung Cancer Cells and Indicates Poor Prognosis. *Curr Cancer Drug Targets* (2019) 19:674–80. doi: 10.2174/1568009618666181119150521
35. Bouamar H, Abbas S, Lin A-P, Wang L, Jiang D, Holder KN, et al. A capture-sequencing strategy identifies IRF8, EBF1, and APRIL as novel IGH fusion partners in B-cell lymphoma. *Blood* (2013) 122:726–33. doi: 10.1182/blood-2013-04-495804
36. Quemeneur L, Angeli V, Chopin M, Jessberger R. SWAP-70 deficiency causes high-affinity plasma cell generation despite impaired germinal center formation. *Blood* (2008) 111:2714–24. doi: 10.1182/blood-2007-07-102822
37. Bradford JW, Baldwin AS. IKK/nuclear factor-kappaB and oncogenesis: roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res* (2014) 121:125–45. doi: 10.1016/B978-0-12-800249-0.00003-2
38. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* (2009) 462:108–12. doi: 10.1038/nature08460
39. Hezaveh K, Kloetgen A, Bernhart SH, Mahapatra KD, Lenze D, Richter J, et al. Alterations of microRNA and microRNA-regulated messenger RNA expression in germinal center B-cell lymphomas determined by integrative sequencing analysis. *Haematologica* (2016) 101:1380–9. doi: 10.3324/haematol.2016.143891
40. Rodig SJ, Kutok JL, Paterson JC, Nitta H, Zhang W, Chapuy B, et al. The pre-B-cell receptor associated protein VpreB3 is a useful diagnostic marker for identifying c-MYC translocated lymphomas. *Haematologica* (2010) 95:2056–62. doi: 10.3324/haematol.2010.025767
41. Ding J, Dirks WG, Ehrentraut S, Geffers R, MacLeod RAF, Nagel S, et al. BCL6-regulated by AhR/ARNT and wild-type MEF2B—drives expression of germinal center markers MYBL1 and LMO2. *Haematologica* (2015) 100:801–9. doi: 10.3324/haematol.2014.120048
42. Neo WH, Lim JF, Grumont R, Gerondakis S, Su I. c-Rel Regulates Ezh2 Expression in Activated Lymphocytes and Malignant Lymphoid Cells. *J Biol Chem* (2014) 289:31693–707. doi: 10.1074/jbc.M114.574517
43. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Couloubay ZA, Roulland S, Young RM, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* (2020) 37:551–568.e14. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.015
44. Kaileh M, Sen R. NF-κB function in B lymphocytes. *Immunol Rev* (2012) 246:254–71. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01106.x
45. 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-κB transcription factor subunits. *J Exp Med* (2014) 211:2103–18. doi: 10.1084/jem.20132613
46. Grumont RJ, Rourke IJ, Gerondakis S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-

- induced apoptosis. *Genes Dev* (1999) 13:400–11. doi: 10.1101/gad.13.4.400
47. Damdinsuren B, Zhang Y, Khalil A, Wood WH, Becker KG, Shlomchik MJ, et al. Single round of antigen receptor signaling programs naive B cells to receive T cell help. *Immunity* (2010) 32:355–66. doi: 10.1016/j.immuni.2010.02.013
48. Rizzo D, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Picquenot J-M, Penther D, et al. Oncogenic events rather than antigen selection pressure may be the main driving forces for relapse in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Hematol* (2017) 92:68–76. doi: 10.1002/ajh.24584
49. de Jesús TJ, Ramakrishnan P. NF- κ B c-Rel Dictates the Inflammatory Threshold by Acting as a Transcriptional Repressor. *iScience* (2020) 23:100876. doi: 10.1016/j.isci.2020.100876

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 Faumont, Taoui, Collares, Jais, Leroy, Prévaud, Jardin, Molina, Copie-Bergman, Petit, Gourin, Bordessoule, Troutaud, Baud and Feuillard. 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.

Supplementary Materials and Methods

Tumors and Patient Cohorts and EMSA studies

For EMSA, the test set comprised a series of 48 tumor frozen samples from DLBCL patients. Clinical data were previously published and summarized in Supplementary Table S1 (1). DLBCL cases were classified as GCB or non-GCB according to the Hans algorithm based on CD10, Bcl-6, and MUM1 expression (2).

Tumor frozen samples of the validation set (n=66) were part (n=220) from a previously published series of DLBCL patients from the GHEDI (*Deciphering the Genetic Heterogeneity of Diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era*) study program including the LNH 98.5 and LNH 2003 LYSA clinical trials with available frozen tumor samples, centralized histopathologic review, and adequate DNA/RNA quality (3). Clinical features of the patients were indicated in Supplementary Table S2.

All DLBCL patients included in this study received standard chemotherapy (CHOP) with anti-CD20 immunotherapy in most cases (Supplementary Tables S1 and S2).

Protein was extracted from frozen tumor sections (30 μ m), in 20 mM HEPES pH 7.9, 25% Glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, and 10 mM DTT. After ultracentrifugation at 40 000 g, protein extract was used for EMSA. Methods for EMSA are described elsewhere (4).

Transcriptomic, and Survival Analysis

For the GHEDI (Dubois) series, the cell-of-origin (COO) molecular classification (ABC, GCB, and Other) was based on the gene expression profile established with HGU133 +2.0 Affymetrix Gene Chip arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) and was done using the Bayesian predictor described by Wright *et al.* and adapted by Monti *et al.* (5,6). The HGU133 +2.0 Affymetrix Gene Chip microarray data set has been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession number GSE87371) (3). LIMMA analysis was performed on the 12 959 most variable genes (Supplementary Table S3). Unsupervised clustering was done using the LPS package (<https://bioinformatics.ovsa.fr/LPS>) and as previously described (7). Effect of c-Rel signature and COO classification as covariates on treatment-free survival (TFS) was examined using the Cox proportional hazard model and the c-Harrel concordance index were determined as previously described (8). Briefly, c-Harrel index is designed to estimate the concordance probability (hereafter the informativeness) by comparing the rankings of two independent pairs of survival times T_i, T_j for patients i and j , and prediction the variable x_i, x_j . Here x_i and x_j take the value 0 or 1 according to the criteria studied (ABC vs GCB classification for exemple). The c-Harrel concordance index can also be interpreted as a summary measure of the area(s) under the time dependent ROC curve(s). With each variable being coded as 1 (present) or 0 (absent), the c-Harrel concordance index was calculated with the "rcorr.cens" command of the Hmisc package (<https://github.com/harrelfe/Hmisc>).

Real-time Quantitative Reverse–Transcription PCR

Total RNA was extracted from frozen biopsies. Complementary DNAs (cDNAs) were reverse transcribed from 1 µg of total RNA samples using the High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). PCR products were amplified from each cDNA using the TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Expression Assays: *REL*, Hs00968436_m1; and *HPRT1*, Hs02800695_m1. The *HPRT1* gene was used as a reference gene for the control of amplification. The calculated relative gene expression level was equal to 2^{-DDCT} , where DDCT is the delta delta cycle threshold (Ct). Gene expression fold changes were calculated as the ratio of the patient to the control EREB2-5 EBV-immortalized human B-cell line.

Probes for FISH analysis

Analysis of *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* translocations by FISH was performed using break-apart FISH DNA probes for *BCL2/18q21*, *BCL6/3q27* (probes Y5407, and Y5408; Dako A/S), *MYC* FISH DNA probe Split Signal (Y5410, Dako A/S) and Vysis LSI *MYC* dual color, BA rearrangement probe (Abbott Laboratories, Chicago, IL),.

Details on the cell cycle arrested EREB2-5 cell line

EREB2-5 cells are a non-classical LCL cell line with an estradiol-inducible EBV-latency III proliferation program due to an estrogen receptor fused to the EBNA2 viral transcription factor. Transfection, and hygromycin selection of EREB2-5 cells were performed as previously described (4). Estradiol starved EREB2-5 cells (cell cycle arrested) were treated with doxycycline (1ng/µL) for 48h to induce expression of the cDNA of interest.

Antibodies

Antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) used for supershift experiments are anti-RelA (F-6), anti-c-Rel (N), anti-p50 (E-10), and anti-Oct-2 (PT-2).

For western blot, the antibodies (Santa Cruz Biotechnology) used were : anti-RelA (F-6), anti-RelB (D-4), anti-c-Rel (N), anti-IκBα (FL), anti-IκBε (ab-22; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (all at 1/200); anti-TRAF1 (G-20) at 1/1000, anti-A20 (A-12) at 1/1000, anti-SAM68 (H-4) at 1/1000, and anti-αTubulin (B-5-1-2, Sigma-Aldrich) at 1/10 000.

Apoptosis analysis

For apoptosis analysis by flow cytometry, cells were first stained with an anti-NGFR-APC antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA) and then, double stained with AnnexinV-FITC (BioLegend, San Diego, CA, USA) and propidium iodide (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) in cold PBS-CaCl₂-MgCl₂ (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). NGFRt positive apoptotic cells were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer.

siRNA experiment

SUDHL-4 cells ($5 \cdot 10^6$) were transiently transfected with 250 pmol siRNA targeting REL mRNA (siREL) or an siRNA control from Santa Cruz Biotechnology using Amaxa® Nucleofector®

Technology with solution V (Lonza; Basel, Switzerland). siREL is a pool of 3 target-specific 19-25 nt siRNAs designed to knock-down REL gene expression. Percentage of dead cells was quantified by flow cytometry 48h after transfection on the SSC/FSC biparametric histogram.

References

1. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, Lalloué F, Gourin M-P, Bordessoule D, Faumont N, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Cancer* (2015) **113**:934–944. doi:10.1038/bjc.2015.274
2. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* (2004) **103**:275–282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545
3. Dubois S, Vially P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J-P, Peyrouze P, Figeac M, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2016) **22**:2919–2928. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2305
4. Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, Durand-Panteix S, Boulin-Deveza M, Gachard N, Youlyouz-Marfak I, et al. RelA and RelB cross-talk and function in epstein-barr virus transformed B-cells. *Leukemia* (2013) doi:10.1038/leu.2013.274
5. 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 U S A* (2003) **100**:9991–9996. doi:10.1073/pnas.1732008100
6. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, Wu B, Pasqualucci L, Neuberg D, Aguiar RCT, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* (2005) **105**:1851–1861. doi:10.1182/blood-2004-07-2947
7. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, Figeac M, Picquenot J-M, Molina TJ, Fest T, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn JMD* (2015) doi:10.1016/j.jmoldx.2015.01.007
8. Chauzeix J, Pastoret C, Donaty L, Gachard N, Fest T, Feuillard J, Rizzo D. A reduced panel of eight genes (ATM, SF3B1, NOTCH1, BIRC3, XPO1, MYD88, TNFAIP3, and TP53) as an estimator of the tumor mutational burden in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* (2020) doi:10.1111/ijlh.13435

1. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, Lalloué F, Gourin M-P, Bordessoule D, Faumont N, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Cancer* (2015) **113**:934–944. doi:10.1038/bjc.2015.274
2. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* (2004) **103**:275–282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545
3. Dubois S, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J-P, Peyrouze P, Figeac M, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2016) **22**:2919–2928. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2305
4. Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, Durand-Panteix S, Boulin-Deveza M, Gachard N, Youlyouz-Marfak I, et al. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B-cells. *Leukemia* (2013) doi:10.1038/leu.2013.274
5. 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 U S A* (2003) **100**:9991–9996. doi:10.1073/pnas.1732008100
6. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, Wu B, Pasqualucci L, Neuberg D, Aguiar RCT, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* (2005) **105**:1851–1861. doi:10.1182/blood-2004-07-2947
7. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, Figeac M, Picquenot J-M, Molina TJ, Fest T, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn JMD* (2015) doi:10.1016/j.jmoldx.2015.01.007
8. Chauzeix J, Pastoret C, Donaty L, Gachard N, Fest T, Feuillard J, Rizzo D. A reduced panel of eight genes (ATM, SF3B1, NOTCH1, BIRC3, XPO1, MYD88, TNFAIP3, and TP53) as an estimator of the tumor mutational burden in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* (2020) doi:10.1111/ijlh.13435

Legends of Supplementary Figures

Figure S1. Analysis flow from the test series of 48 DLBCL patients. Good quality of mRNA and protein extracts was obtained from 44 and 32 patients respectively. Analysis of both mRNA expression and EMSA were done on 28 samples. Additional samples were analyzed for mRNA expression (n=16) or EMSA (n=4) only.

Figure S2. Experimental design of gene expression analysis. First, step (1) indicates unsupervised expression analysis of 237 genes previously found differentially expressed between DLBCL patients characterized by high or low c-Rel DNA-binding activity (EMSA): 74/202 (37%) and 90/233 (39%) patients with c-Rel GEP (*Gene Expression Profile*) from the GHEDI and LENZ series respectively. Secondly, step (2) corresponds to *REL* gene expression analysis (from 4 probesets): 100/202 (50%) and 113/233 (48%) patients with *REL* mRNA overexpression from the GHEDI and LENZ series respectively. Finally, step (1) + (2) designates patient samples with c-Rel signature meaning with both c-Rel GEP and *REL* mRNA overexpression: 60/202 (30%) and 69/233 (30%) patients with c-Rel signature from the GHEDI and LENZ series respectively.

Figure S3. Overall survival (OS) of 137 DLBCLs from the GHEDI cohort classified according to c-Rel signature and EZB (with EZH2 mutations and BCL2 translocation) or other GCB genetic subtypes. OS of EZB-DLBCL patients and GCB-DLBCL patients with c-Rel and non-c-Rel signature. The log-rank p-value is given within each graph.

Figure S4. Mortality of GCB-DLBCL cell line under siRNA-REL transfection. SUDHL-4 cells were transiently transfected with siRNA targeting *REL* mRNA (siREL) or siRNA control (siCtl). At 48h post-transfection, expression of c-Rel and α Tubuline expressions (**A**) and percentage of dead cells (**B**) were analyzed by western blot and flow cytometry respectively. In panel B, Mortality fold change is the ratio to the mean of control conditions.

Supplementary Tables

Table S1. Clinical data from the test series.

Clinical Parameter	Total
Gender M/F, n	29/19
Age (Median, range)	65 (15 – 93)
Subtype, n (%)	
Non-GCB	18/48 (38%)
GCB	30/48 (62%)
Nodal / Extranodal, n (%)	
Nodal	31 (65%)
Extranodal	17 (35%)
Adverse Prognostic Factors	
Age > 60 years, n, (%)	30/48 (62%)
Ann Arbor stage III-IV	28/47 (60%)
LDH>Normal	19/46 (41%)
Performans Status ≥ 2	13/44 (30%)
IPI	
0 - 2	26/45 (58%)
3 – 5	19/45 (42%)
Treatment	
R-chemotherapy	39/48 (81%)
Chemotherapy without R	5/48 (11%)
Other	4/48 (8%)

Table S2. Clinical data from the GHEDI (Dubois) series.

Clinical Parameter	Total
Gender M/F, n	104/98
Age (Median, range)	61 (19 – 87)
Subtype, n (%)	
ABC	83 (41%)
GC	85 (42%)
Other	34 (17%)
Nodal / Extranodal, n (%)	
Nodal	158 (78%)
Extranodal	43 (21.5%)
Unknown	1 (0.5%)
Adverse Prognostic Factors	
Age > 60 years, n, (%)	106 (52%)
Ann Arbor stage III-IV	144 (71%)
LDH>Normal	124 (61%)
Performans Status ≥ 2	34 (17%)
IPI	
0 - 2	103 (51%)
3 - 5	99 (49%)
Treatment	
R-chemotherapy	188 (93%)
Chemotherapy without R	14 (7%)

Table S3. The HGU133 +2.0 Affymetrix Gene Chip microarray data set (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession number GSE87371) (1–4). LIMMA analysis was performed on the 12 959 most variable genes.

Table S4. c-Rel DNA-binding activity related genes, *i.e.* c-Rel gene expression profile (GEP). Analyzed by Affimatrix GEP of DLBCLs from the GHEDI cohort. A set of 343 probesets/237 genes with a fold change of two between high and low or negative c-Rel binding cases was selected after LIMMA analysis.

Table S5. Overlaps between the two branches of down and up-regulated genes of the c-Rel gene expression profile of the two clusterings from the GHEDI and Lenz series.

Table S6. Set of 424 differentially expressed genes (622 probesets) with a fold change of two between ABC and GCB-DLBCLs from the training series: 66 cases from the GHEDI cohort. This ABC-GCB GEP consisted of 177 (279 probesets) and 247 (343 probesets) up-regulated genes in ABC (ABC-up) and GCB (GCB-up) DLBCLs respectively. Genes of the ABC/GCB Wright's predictor (5) are indicated.

Table S7. Overlap between c-Rel and ABC-GCB gene expression profiles (*i.e.* c-Rel AND ABC-GCB gene set) corresponding to 55 genes and 88 probesets.

Table S8. Classification of 137 DLBCLs from the GHEDI cohort according to genetic subtypes defined by Schmitz *et al* (6): BN2 (based on *BCL6* fusions and *NOTCH2* mutations), EZB (based on *EZH2* mutations and *BCL2* translocations), MCD (based on the co-occurrence of *MYD88L265P* and *CD79B* mutations), N1 (based on *NOTCH1* mutations), "other ABC", "other GCB", and "other unclassified".

Bibliography

1. Dubois S, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J-P, Peyrouze P, Figeac M, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell

Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2016) 22:2919–2928. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2305

2. Bobée V, Ruminy P, Marchand V, Viailly P-J, Abdel Sater A, Veresezan L, Drieux F, Bérard C, Bohers E, Mareschal S, et al. Determination of Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Classifier: A CALYM Study. *J Mol Diagn JMD* (2017) 19:892–904. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.07.007

3. Jais J-P, Molina TJ, Ruminy P, Gentien D, Reyes C, Scott DW, Rimsza LM, Wright G, Gascoyne RD, Staudt LM, et al. Reliable subtype classification of diffuse large B-cell lymphoma samples from GELA LNH2003 trials using the Lymph2Cx gene expression assay. *Haematologica* (2017) 102:e404–e406. doi:10.3324/haematol.2017.166827

4. Dubois S, Tesson B, Mareschal S, Viailly P-J, Bohers E, Ruminy P, Etancelin P, Peyrouze P, Copie-Bergman C, Fabiani B, et al. Refining diffuse large B-cell lymphoma subgroups using integrated analysis of molecular profiles. *EBioMedicine* (2019) 48:58–69. doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.034

5. 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 U S A* (2003) 100:9991–9996. doi:10.1073/pnas.1732008100

6. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, Roulland S, Kasbekar M, Young RM, Shaffer AL, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2018) 378:1396–1407. doi:10.1056/NEJMoa1801445

4. Dubois S, Tesson B, Mareschal S, Viailly P-J, Bohers E, Ruminy P, Etancelin P, Peyrouze P, Copie-Bergman C, Fabiani B, et al. Refining diffuse large B-cell lymphoma subgroups using integrated analysis of molecular profiles. *EBioMedicine* (2019) 48:58–69. doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.034

5. 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 U S A* (2003) 100:9991–9996. doi:10.1073/pnas.1732008100

6. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, Roulland S, Kasbekar M, Young RM, Shaffer AL, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2018) 378:1396–1407. doi:10.1056/NEJMoa1801445

Chapitre 2. Rôle de la sous-unité c-Rel NF-κB dans le GCB-DLBCL : établissement d'un modèle murin pré-clinique

Pour faire suite à l'étude de Faumont et al. (*Faumont et al.2021*), nous avons souhaité établir un modèle murin surexprimant la sous-unité c-Rel NF-κB dans la cellule B. Nous avons donc choisi d'établir des modèles conditionnels modélisant une surexpression de c-Rel dans tous les lymphocytes B (grâce au système CD19-Cre), et spécifiquement dans les LB du GC (grâce au système AID-Cre^{ert2}).

Tout d'abord quelques explications sur la génération et la génétique **du modèle REL-YFP** que j'ai créé à mon arrivée en thèse. Le transgène dans ce modèle REL-YFP correspond au cDNA codant c-Rel suivi d'une séquence IRES (Internal ribosome entry) puis d'un marqueur fluorescent YFP (Yellow Fluorescent protein). L'expression de c-Rel est donc concordante à celle de la YFP. Le transgène est introduit au locus Rosa26. Le locus Rosa26 est localisé sur le chromosome 6 de la souris et constitue un outil de choix pour la génération de KI (Knock-in).

Le locus Rosa26 est constitué de 3 exons et est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les types cellulaires et ce quel que soit les stades de développement mais n'est pas à proprement parlé traduit en protéine (*Zambrowicz, B. P et al. 1997*). L'intégration d'un transgène pour la construction de modèles murins transgéniques au locus Rosa26 se fait traditionnellement dans le premier intron (*Friedrich, G., & Soriano, P. 1991*). Le vecteur de ciblage Rosa26 s'étend de 1kB en amont et de 4Kb en aval du site d'intégration situé dans le premier intron (*Soriano, P. 1999*). Dans la procédure classique d'établissement de ciblage transgénique, les clones d'ES transfectés avec le vecteur de ciblage sont par la suite injectés dans des blastocystes pour obtenir une lignée germinale de souris chimériques, animaux facilement identifiables par observation de leur pelage. Cela constitue le témoin clé d'une possible transmission de l'allèle transgénique à la progéniture. Cette approche requiert cependant le maintien en culture de cellules ES qui peut s'avérer laborieux et le temps d'obtention d'une population F1 arborant la mutation choisie s'étend sur une période de 9 à 12 mois. Bien que nous n'ayons pas choisi cette approche, l'utilisation du locus Rosa26 est tout à fait compatible avec la technique de CRISPR/Cas9 pour l'établissement de KI murins transgéniques (*Chu, V. T et al. 2016*).

Le transgène REL-YFP au locus Rosa26 est schématisé en Figure 1. Il est précédé par une cassette stop plus une séquence de résistance à la néomycine flanquées de sites LoxP. Notons qu'il s'agit de la séquence codante de c-Rel murin.

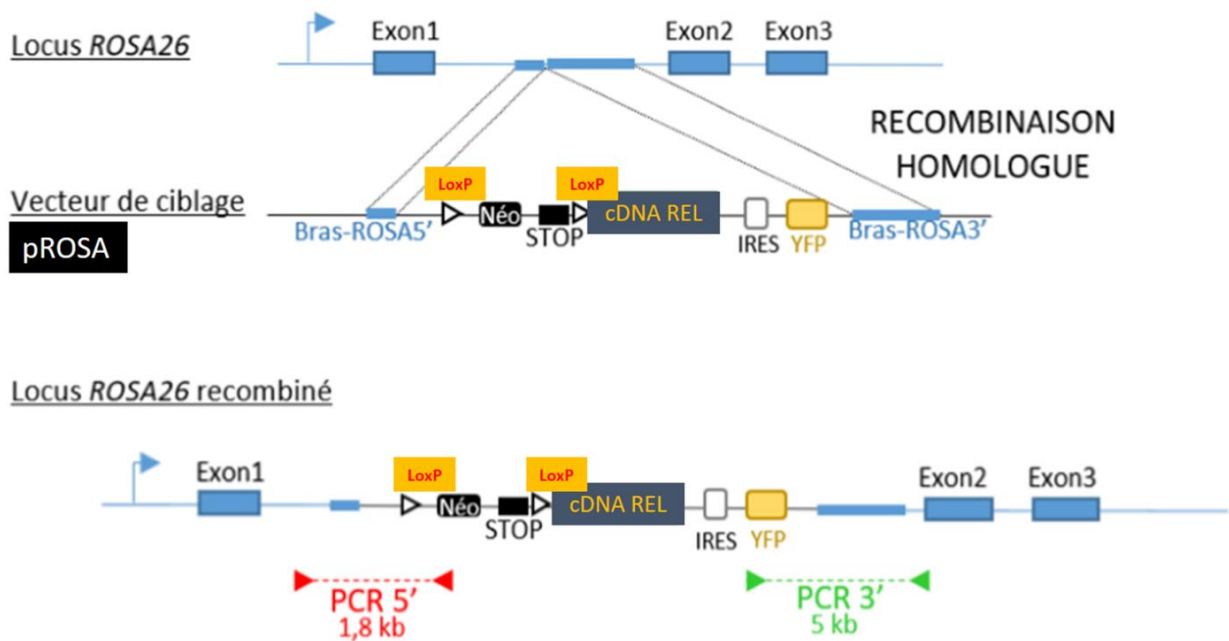


Figure 1. **Stratégie de Knock In c-Rel au locus Rosa26**

Représentation schématique du locus Rosa26, le vecteur de ciblage comportant le cDNA de REL, la cassette stop néomycine, les sites LoxP, la séquence IRES ainsi que le marqueur de fluorescence YFP.

La procédure d'obtention des animaux chimères portant le transgène REL-YFP est résumée sur la Figure 2.

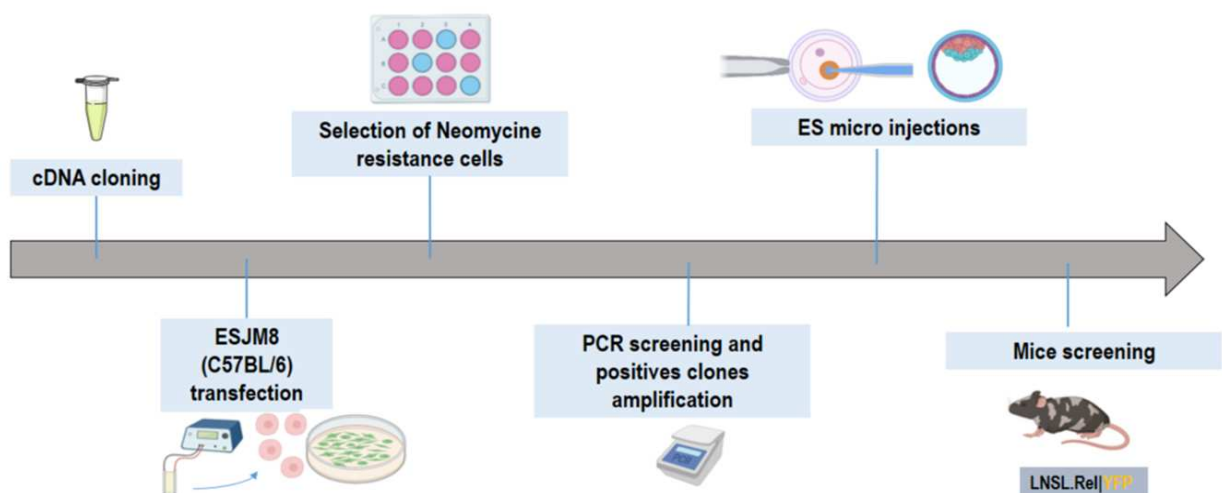


Figure 2. **Procédure d'obtention d'animaux surexprimant c-Rel à partir d'un vecteur de ciblage au locus Rosa26**

Le vecteur de ciblage au locus Rosa26 est transfecté dans des cellules ES-JM8 de souris C57BL/6 ensemencées sur un tapis de fibroblastes embryonnaires murins préalablement

mitomycinés. Notons que ces cellules souches portent un déterminisme génétique vers un pelage marron permettant leur injection dans des blastocystes de souris également C57BL/6 (pelage noir).

Une fois que les cellules ES transfectées ont adhéré de nouveau aux fibroblastes, l'ajout de néomycine va permettre la sélection des clones résistants ayant la construction génique d'intérêt. Les clones positifs vont ainsi proliférer et grossir au fur et à mesure de la sélection. Quand les clones sont bombés et de taille conséquente, ils sont repiqués un à un sous microscope afin d'amplifier chaque clone positif puis de les congeler. A partir de l'ADN de ces clones, nous réalisons des PCR appropriées afin de vérifier l'insertion de notre transgène par recombinaison : une PCR en 5' puis 3' du transgène (voir Figure 2).

Cette banque de clones d'intérêt a été réalisée avant mon arrivée en thèse. Les clones positifs sont ensuite décongelés et remis en culture sur des fibroblastes afin d'être amplifiés. Ils sont alors micro-injectés dans des blastocystes, lesquels sont réintroduit dans des femelles pseudo-gestantes afin d'obtenir les premiers animaux chimériques. Ces animaux sont ensuite croisés avec des souris sauvages C57BL/6, et la descendance F1 est génotypée pour la présence du transgène REL-YFP par PCR. Les animaux homozygotes sont ensuite obtenus.

Cette lignée de souris REL-YFP va pouvoir exprimer le transgène qu'à condition que l'action de la Cre recombinase élimine la cassette Stop. C'est pourquoi ces souris transgéniques REL-YFP sont croisées aux souris CD19-Cre pour une expression B spécifique, ou aux souris AIDCre^{ert2} pour une expression GCB spécifique. C'est donc le type de Cre Recombinase qui va permettre d'assurer l'expression du transgène dans un type cellulaire donné.

Partie I. Notre souris transgénique REL-YFP est croisée avec une souris CD19-Cre de fond génétique BALB/c (**B6.129P2(C)-Cd19^{tm1(cre)Cgn}/J**). Nous obtenons ainsi **le modèle CD19-Cre/REL-YFP**. Chaque souris est ensuite génotypée par PCR pour déterminer la présence de la Cre au locus CD19 et la présence du transgène REL-YFP au locus Rosa26. Il est alors possible de vérifier l'expression du transgène c-Rel en suivant la fluorescence YFP par cytométrie en flux à partir des lymphocytes B du sang. On prélève du sang en submandibulaire puis un marquage CD19 et B220 pour cibler les B est réalisé. Après lyse des globules rouges, nous pouvons constater que la population de cellules B est fortement positive pour le marqueur YFP. Nous avons suivi nos souris tous les mois durant 1 an par prélèvement de sang et immunophénotypage, et les souris ont été sacrifiées pour réaliser des marquages sur les organes d'intérêt : rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques et liquide intra péritonéal. Nous n'avons pas vu de modifications majeures et significatives sur ce modèle de surexpression de c-Rel dans les cellules B (résultats non montrés). Les lymphocytes B de ce modèle CD19-Cre/REL-YFP ont été utilisés pour réaliser des expériences de différenciation *ex vivo* en GCB (CD38^{faible}, GL7+, CD95+). Vous trouverez les résultats dans l'article ci-après.

Nous avons aussi créé **le modèle murin REL-AID** qui permet l'expression du transgène REL-YFP uniquement dans les lymphocytes B des centres germinatifs. Ce modèle est créé par croisement de nos souris REL-YFP avec le modèle TOM-AID-Cre^{ert2}. L'expression de la Cre est sous le contrôle du promoteur AID, les cellules B engagées dans une réaction immunitaire T-dépendante vont acquérir un marqueur fluorescent, tdTomato. Pour ce faire, la séquence codante du marqueur tdTomato (TOM) est insérée au locus Rosa26 avec une cassette Stop flanquée de site LoxP. Notons que ces souris TOM-AID-Cre^{ert2} portent les transgènes TOM et Cre^{ert2} sur le même chromosome 6 (les loci *Aicda* et *Rosa26* sont tous les deux situés sur le

chromosome 6 avec une séparation de 9.48 Mb). Elles ont été obtenues au laboratoire par le croisement des souris AID-Cre^{ert2} (Dogan, I et al. 2009) et des souris Ai14 qui portent le transgène TOM avec sa cassette Stop au locus Rosa26 (doi:10.1038/nl.1814 AND PubMed:20023653).

L'enzyme Cre^{ert2} est inducible au tamoxifène, sa séquence codante est insérée dans le second exon du gène *Aicda*, et est fusionnée au 4 premiers acides aminés de AID (Figure 3).

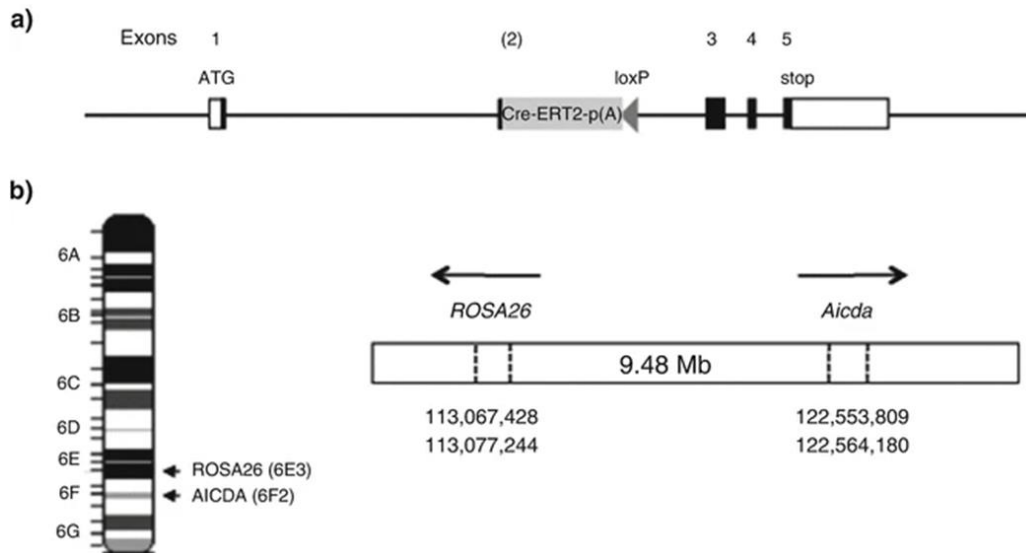


Figure 3. Schéma du KI AID Cre ERT2 situé sur le chromosome 6

(a) Représentation de la séquence de l'AIDCre ERT2 inductible au tamoxifène (donnée par D. Metzger, Strasbourg) a été insérée à la place de l'exon 2 du gène *Aicda*, fusionnée avec les premiers acides aminés de AID (codé par 12 nucléotides dans l'exon 1 et 4 nucléotides dans l'exon 2) et suivie par un site SV40 poly(A) (Dogan I et al.2009). Un gène de résistance à la néomycine *Neo^R* flanqué de sites *LoxP* a été utilisé pour sélectionner les constructions transfectées dans les ES et assurer l'excision par transfection transiente de la Cre laissant ainsi 1 site *loxP* en aval de la queue polyA. Le site accepteur d'épissage de l'exon 3 a été muté afin d'éviter le saut de l'exon Cre ERT2. (Les carrés noirs représentent les exons codants, les carrés blancs les exons non codants). (b) Loci *Aicda* et *Gt(ROSA)26or* ou *Rosa26* sont séparés de 9.48 mb sur le chromosome 6 (à gauche avec les bandes de caryotypes). Une lignée murine dans laquelle le rapporteur *ROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP* (Srinivas, S et al.2001) et les locus *Aicda* recombinés situés sur le même chromosome a été générée (la numérotation représente les limites 5' et 3' des deux gènes comme ils ont été référencés dans l'annotation du génome murin 105, leurs orientations est représentés par des flèches horizontales). (D'après Le Gallou, S et al. 2017).

La fusion de la Cre au récepteur aux œstrogènes ESR1 (mice estrogen receptor 1) permet d'activer la Cre uniquement en présence de métabolites du tamoxifène (Donocoff, R. S et al. 2020). Ainsi la présence simultanée d'une stimulation antigénique SRBC (sheep red blood cells) et de tamoxifène permettra l'expression de la Cre et son activité respectivement, uniquement dans les lymphocytes B des centres germinatifs.

Notre modèle REL-AID est donc soumis au tamoxifène (J0, J2 et J4) et aux SRBC (J0) pour créer un pool de lymphocytes B du GC qui sera suivi dans le temps : cellules B à la fois YFP et tdTomato positives. Des immunisations mensuelles SRBC sont réalisées selon deux protocoles présentés dans les résultats qui vont suivre.

De l'expérience du groupe, l'efficacité de la Cre est d'autant plus grande que le segment à éliminer est petit. Nous avons donc introduit au locus Rosa26, le cDNA du gène *REL* murin précédé d'une cassette STOP-Néomycine flanquée de sites LoxP de 2540 pb. Cette dernière étant plus grande que la cassette Stop en amont de tdTomato (870 pb), nous créons un pool de lymphocytes B du GC doublement fluorescents tdTomato+/YFP+ (surexprimant c-Rel) ainsi que le pool contrôle simple fluorescent tdTomato+ (sans c-Rel surexprimé). Nous pouvons ainsi suivre la compétition entre ces deux populations B et apprécier l'effet de c-Rel.

Avec ce modèle murin REL-AID, nous créons l'évènement moteur *i.e.* la surexpression de c-Rel, dans le microenvironnement du GC que l'on suppose prompt à la transformation.

Vous trouverez dans les pages qui vont suivre les résultats de ma thèse rédigés sous forme d'un article actuellement soumis pour publication et également déposé sur bioRxiv (<https://www.biorxiv.org/>) : REL deregulation stands as a primary hit for AID-imprinted B-cells along the germinal center competition

Léa Prévaud, Christelle Vincent-Fabert, Tiffany Marchiol, Quentin Lemasson, Catherine Ouk, Claire Carrion, Michel Cogné, Jean Feuillard, Nathalie Faumont

bioRxiv 2023.10.10.561773; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.10.561773>

Title: *REL* deregulation stands as a primary hit for AID-imprinted B-cells along the germinal center competition

Short title: *REL*pos and *REL*neg B-cell dual color fate mapping

Léa Prévaud¹, Christelle Vincent-Fabert¹, Tiffany Marchiol¹, Quentin Lemasson¹, Catherine Ouk¹, Claire Carrion¹, Michel Cogné², Jean Feuillard^{1,3}, Nathalie Faumont¹.

1 : Unité Mixte de Recherche (UMR) CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL, Université de Limoges, Limoges, France.

2 : Unité Mixte de Recherche (UMR) INSERM U1236, Université de Rennes and Etablissement Français Du Sang Bretagne, France.

3 : Laboratoire d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges

Corresponding author : Nathalie Faumont, UMR CRIBL CNRS7276/INSERM1262, Centre de Biologie et de Recherche en Santé, CHU et Faculté de Médecine de Limoges, Av Bernard Descottes, 87025 Limoges Cedex, France. nathalie.faumont@unilim.fr.

Scientific category: Immunobiology and Immunotherapy

Key points:

- *REL* provides a long-term competitive advantage allowing for GC B-cell persistence and continuous recirculation of AID-imprinted B-cells
- AID-imprinted B-cells overexpressing *REL* can occasionally transform into aggressive B-cell lymphomas

Explanation of the novelty:

By showing in a new dual-color mouse model that dysregulation of *REL* in a very limited pool of AID-imprinted B-cells confers a strong long-term competitive advantage in the context of repeated immune responses and may occasionally lead to transformation into an aggressive B-cell lymphoma, we provide for the first time experimental evidence supporting the fact that that *REL* is most likely a primary event in the aggressive transformation of germinal center B-cells.

Abstract

In diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs), gains and amplifications of the 2p15-16 region, which always encompass the *REL* gene, are mostly restricted to the germinal center (GC) B-cell DLBCL subtype (GCB-DLBCL) for which c-Rel is the pivotal Rel/NF- κ B subunit. While *REL* is also known to play a key role in the GC reaction, its contribution to GCB-DLBCL transformation is still unclear.

To understand the role of *REL* in the very first steps of GCB transformation, *i.e.* when B-cells with deregulated *REL* are competing with other B-cells during chronic antigenic stimulation, we have created a dual-color mouse that allows to induce *REL* in a limited pool of AID-imprinted B-cells after immunization and to differentially stain AID-imprinted B-cells cells that overexpress *REL* or not. Our results demonstrate that dysregulation of *REL* at the GC B-cell stage promotes GC B-cell expansion and favors both class-switch recombination and plasma cell differentiation. Additionally, although *REL* overexpression was neutral on post-GC memory B-cell differentiation, it did confer a long-term competitive advantage allowing for GC persistence and continuous recirculation of *REL*-overexpressing B-cells. Functionally, *REL* enhanced the protection against apoptosis in the early steps of GCB differentiation. *REL*-overexpressing B-cells can my occasionally transform into in an aggressive B-cell tumor.

Highlighting the role of repeated immune responses, our results confirm the role of *REL* in the germinal center reaction and provide evidence supporting the fact that genetic deregulation of c-Rel expression is most likely a primary event in the aggressive transformation of GC B-cells.

(3988 mots)

Introduction

C-Rel, the cellular equivalent of v-Rel, the oncogenic protein of Reticuloendotheliosis virus REV-T, a causative agent of lymphoid tumors in poultry, gave its name to the Rel homology domain (RHD) DNA-binding domain, that characterizes the Rel/NF- κ B transcription factor family¹. Rel/NF- κ B transcription factors are composed of five sub-units, RelA, c-Rel, RelB, p50 and p52, the three formers with a transcriptional activation domain. The five Rel/NF- κ B subunits associate with each other to form transcriptionally active dimers. These complexes are retained in the cytoplasm by interaction with their inhibitors, the I κ Bs. Resulting from a variety of external signals, NF- κ B activation consists in the proteosomal degradation of the I κ Bs, and the nuclear translocation of Rel/NF- κ B dimers where they regulate numerous genes critical for lymphocyte development, innate and adaptive immunity, inflammation as well as for control of both cell proliferation and cell death². The canonical (or classical) NF- κ B activation pathway involves nuclear translocation of RelA or c-Rel containing dimers whereas the non-canonical (alternative) pathway corresponds to nuclear translocation of RelB complexes³. In contrast to RelA and RelB, c-Rel does not contain a nuclear export signal and can accumulate in the nucleus upon chronic NF- κ B activation⁴.

It is now very well established that constitutive NF- κ B activation is the hallmark of several B-cell neoplasms, either indolent such as Waldenström Macroglobulinemia (WM), which harbors a MYD88 activating mutation in more than 90% cases, or aggressive lymphomas such as Epstein Barr virus (EBV) related lymphoproliferative disorders with expression of the EBV oncogenic protein LMP1 or diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) with an activated phenotype (ABC-DLBCLs). In this latter group, NF- κ B activation is genetically related to

mutations in the NF- κ B activation track such as those of MYD88, CD79A, CARD11 or TNFAIP3⁵.

It has only recently been recognized that the three NF- κ B subunits RelA, RelB and c-Rel may have distinct and specific roles in B-cell lymphomagenesis, the latter being associated with DLBCLs with a germinal center (GC) B-cell phenotype (GCB-DLBCLs)⁶⁻⁸. In DLBCLs, 2p15-16 gains/amplifications, which include *REL*, are almost restricted to the GCB-DLBCL subtype^{9,10}, being found in 15-37% of cases¹¹ while it is almost never found in ABC-DLBCLs⁹. Some reports indicate that the minimal common region of 2p15-16 gains/amplifications always includes *REL*¹². *REL* gains/amplifications, which are the first genetic aberration of the Rel/NF- κ B system reported in DLBCLs¹³, are recurrently found in various B-cell cancers such as classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal B cell lymphoma, or chronic lymphocytic leukemia¹⁴. Such *REL* imbalances are also found in 20-35% of follicular lymphoma (FL) in transformation (tFL), a poor prognosis FL subtype, close to and with a similar mutational pattern than GCB-DLBCLs¹¹. In contrast with other NF- κ B subunits, c-Rel overexpression is very likely to be sufficient to obtain the c-Rel effects^{7,15,16}. C-Rel plays a critical role in sustaining prolonged NF- κ B responses in B cells and chronic BCR stimulation results in nuclear c-Rel accumulation with upregulation of pro-survival genes, whereas nuclear RelA is almost undetectable under these conditions¹⁵. The *REL*^{-/-} mice exhibit reduced proliferation and activation of mature B cells in response to immunization associated with impaired GC formation¹⁷. In normal B-cells, c-Rel is a key transcription factor for GC reaction long-term maintenance¹⁸. In GCs, c-Rel and c-Myc would be active in the same B-cells and c-Rel would be involved in a metabolic program that would facilitate cell growth¹⁹. Therefore, there is robust genetic and pathophysiological evidence supporting the involvement of c-Rel in the aggressive transformation of GC B-cells.

If *REL* is a good candidate oncogene for aggressive GC B-cell transformation, it remains unclear whether it is a primary or secondary genetic event. As exemplified by FLs, a primary genetic event would occur in a very limited number of B-cells. These hit B-cells would compete with their normal counterparts for years or even decades in the context of a complex and evolving immune environment²⁰. To address the question of the role of *REL* at the very first steps of GC B-cell transformation, we developed a dual-color mouse model that allows to induce c-Rel overexpression in a limited pool of AID-imprinted B-cells after immunization with a complex antigen and to differentially stain AID-imprinted B-cells cells that overexpress *REL* or not.

Material and Methods

Generation of mouse models (detailed in Supplemental Materials and Methods)

The conditional REL-YFP mouse model was generated for this study. The targeting vector pROSA-mREL-YFP was obtained by insertion of a 3521 pb AscI/AscI fragment containing the murine *REL* cDNA followed by an internal ribosome entry sequence (IRES) for the expression of the yellow fluorescent protein (YFP) coding sequence (the REL-YFP transgene, synthesized by GeneCust, Luxembourg), into the previously published pROSA26-1 vector²¹.

The AID.Cre^{ert2}-TOM model (thereafter called AID-TOM) was obtained by crossing previously published AID.Cre^{ert2} and Ai14 mouse models²². AID-TOM or CD19-Cre mice²³ and REL-YFP mice were crossed to induce the expression of the transgene in AID- imprinted or CD19pos B cells respectively: the REL-AID and REL-CD19-Cre mouse models.

Tamoxifen induction and immunization

Immunization consisted of an intraperitoneal injection of $2 \cdot 10^9$ sheep red blood cells (SRBCs) on day 0 and monthly thereafter. Tamoxifen was purchased from Gibco (Gibco Thermo Fisher Scientific France, Illkirch-Graffenstaden, France). Tamoxifen was administrated by gavage at 40 mg/kg on day 0, 2 and 4.

Flow cytometry analysis from blood, and lymphoid organs

Blood samples were collected retro-orbitally. Spleen and lymph node cells were filtered on a 70 μ m filter (Miltenyi Biotech SAS, Paris France). Peritoneal lavage was performed with three mL of phosphate-buffered saline. After red blood cell lysis, cells were labeled with fluorescent conjugated monoclonal antibodies listed in Supplemental Materials and Methods. Flow

cytometry was performed with the CytoFLEX LX apparatus (Beckman Coulter France, Villepeinte, France). Results were analyzed using the Kaluza software (Beckman Coulter).

Stimulation and Cell Culture

For proliferation analysis, splenocytes were labeled with five μ M CellTrace™ Violet reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were then stimulated for four days with either CD40, IL4, ODN CpG or LPS as detailed in Supplemental Materials and Methods and analyzed by flow cytometry using a CytoFLEX LX (Beckman Coulter) after B220 labeling.

Ex vivo induction of germinal center B-cell differentiation.

Splenic B cells were negatively sorted using the Pan B cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Induction of germinal center B-cell differentiation was done following the protocol of T. Nojima et al (details in Supplemental Materials and Methods).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the GraphPad software (GraphPad Software, Boston, MA). These included Student t-tests, chi-square tests, non-parametric tests and analysis of variance (ANOVA) were performed with the GraphPad software.

Results

B-cells overexpressing *REL* or not following AID-induction can be differentially fate-mapped

To understand the consequences of *REL* constitutive overexpression at the germinal center B cell stage and beyond, we first generated the REL-YFP mouse model. Preceded by a STOP-Neomycin (STOP-Neo) cassette flanked by loxP sites, the murine *REL* transgene was introduced in the Rosa26 locus on chromosome 6 (Figure 1A, top panel). The *REL* transgene is followed by an IRES to allow concomitant expression of the yellow fluorescent marker YFP. In parallel, we modified the tamoxifen-regulatable AID.Cre-ert2 mouse model of Dogan et al.²² to introduce a sequence encoding the red tdTomato marker preceded by a STOP cassette flanked by loxP sites (Figure 1A). Mice were wisely selected to retain those in which a crossing-over event placed the flox_tdTomato transgene in cis to AID.Cre-ert2 allele at the Rosa26 locus: the AID-TOM model (figure 1A, lower panel). Breeding REL-YFP with AID-TOM mice resulted in the dual-color REL-AID model. In this model, the two tdTomato and REL-YFP transgenes are both AID-inducible and tamoxifen-regulatable.

To induce a very limited number of B-cells in the context of complex repeated immune responses, our protocol consisted of an initial tamoxifen Cre-ert2 induction together with chronic immunization with a complex T-dependent antigen, in this case sheep red blood cells (SRBC) (Figure 1B). Using AID-TOM mice as a control, we intraperitoneally injected SRBCs on day 0 (D0) together with tamoxifen gavage on D0, D2 and D4 (Figure 1B), which would favor initial germinal center formation. For long term GC maintenance, monthly SRBC immunization recalls were conducted for four or five months. At month 5 (M5), mice were either sacrificed shortly after chronic immunization or monitored for six to eight months before

being sacrificed in order to study the persistence of TOM+/YFP+ B cells long time after the end of immunization (Figure 1B).

As shown in figure 1C, circulating TOM+ B-cells could be detected in both AID-TOM and REL-AID mice at D14, accounting for 0.79% - 2.14% of total circulating B-cells, with no significant differences between the two mouse strains. As the Cre efficiency is inversely dependent on the size of the cassette to be excised between the loxP sites, not all B-cells that had deleted the 870 bp long STOP cassette of the AID.Cre-ert2 allele had also eliminated the 2540 bp long STOP-Neo cassette of the wild-type AID allele. At D14, 28.5% +/- 2.4% of TOM+ circulating B-cells were also YFP+ (figure 1D). Therefore, thanks to the YFP and tdTomato reporters, this dual-color model allows for differentiated fate-mapping of TOM+/YFP+ (RELpos) and TOM+/YFP- (RELneg) B cells upon tamoxifen administration after AID-imprinting (likely to be due to germinal center passage) within the same animal.

Long-term competitive advantage of *REL* overexpressing B-cells when compared to their *REL* negative counterpart.

After initial tamoxifen induction of Cre-ert2 activity in AID-TOM control mice, the levels of circulating TOM+ B-cells moderately decreased despite SRBC immunization recall. Then, TOM+ B-cell percentages remained stable as long as mice were repeatedly immunized, implying an equilibrium or a stationary state between blood entry and exit of TOM+ B-cells. This would indicate a continuous recirculation and/or production of TOM+ B cells in secondary lymphoid organs. Subsequently, TOM+ B-cells gradually diminished to near-zero levels as immunization recalls ended, revealing the reliance of TOM+ B-cell production. This indicates a continuous recirculation and/or production of TOM+ B cells in secondary lymphoid organs.

Then, TOM+ B-cells progressively reached levels close to zero as immunization recalls stopped, which shows the dependency on the immune response. Contrary to AID-TOM mice, REL-AID mice exhibited stable levels of circulating TOM+ B-cells not only during the immunization period but also for up to two months after cessation of immunization before declining (Figure 2A). This shows that *REL* overexpression led to an increase in production (blood entry increase) and/or survival (blood exit decrease) of TOM+ B-cells. The extent of this increase was also influenced by the persistence of the immune response.

As shown in figure 2B and 2C, the increased production and/or survival of TOM+ B-cells in REL-AID mice was due to TOM+/YFP+ double positive, i.e to *REL* overexpressing B-cells. Indeed, percentages of TOM+ cells among total circulating B-cells were strongly correlated with those of YFP+ cells within the TOM+ B-cell fraction at M2 and M12 (Figure 2B), which is in contrast with the result at D14 (Figure 1D). Figure 2C shows the progressive but rapid, consistent and persistent accumulation of YFP+ B-cells within the TOM+ B-cell compartment, even when immunization recalls ceased. Compared to TOM+ B-cells from AID-TOM mice or TOM+/YFP- B-cells from REL-AID mice, TOM+/YFP+ B-cells over-expressed CD80 (Figure 2D), a marker of NF- κ B that is known to be expressed on a subset of memory B-cells²⁴ and to be increased upon c-Rel activation²⁵.

Collectively, these results first demonstrate that recirculation of AID imprinted B-cells is highly dependent on chronic immunization. They also strongly support a significant long-term competitive advantage of B-cells that have benefited from a *REL* overexpression event when compared to their *REL* negative counterpart.

Expansion and persistence of REL-overexpressing B-cells in secondary lymphoid organs.

Shortly after immunization, the proportion of TOM+ B-cells was increased in the peritoneum, i.e at the SRBC injection site, when compared to the spleen or lymph nodes in AID-TOM control mice (Figure 3B), again indicating the role of antigen stimulation in promoting AID-imprinted B-cells. This phenomenon was markedly increased in REL-AID mice, as TOM+ B-cells ranged from 10% to 50% of total B-cells in the peritoneum (Mann-Whitney test, $p=0.057$). Although heterogeneous, levels of TOM+ B cells were also increased in spleen and lymph nodes of REL-AID mice, and most of these TOM+ B-cells were also YFP+. Spleen histology was similar in both control AID-TOM and REL-AID mice with large and somewhat coalescing lymphoid nodules and expanded B-cell areas (Figure 3C) as well as numerous plasma cell sheets in the red pulp (supplemental figure S1). However, one REL-AID mouse of this cohort, marked with an arrow in Figure 3, developed a diffuse large B-cell lymphoma (supplemental figure S2). In this mouse, almost all TOM+ B-cells were also YFP+, i.e were overexpressing *REL* (Figure 3B, lower panel).

Long time after immunization, while persisting in the peritoneum, TOM+ B-cells almost disappeared from both spleen and lymph nodes of AID-TOM mice. In contrast, TOM+ B-cells persisted, albeit at lower levels and more heterogeneously than immediately after immunization in both spleen and lymph nodes and remained higher in the peritoneum of REL-AID mice. Again, most TOM+ B-cells from REL-AID mice were also YFP+ (Figure 3E). Reflecting resting spleens, spleen histology showed small lymphoid nodules with increased red pulp areas in 8/9 (89%) control AID-TOM. In contrast REL-AID mice tended to retain large lymphoid nodules with increased B-cell areas in 12/14 (86%) cases (Khi2 test, $p=7.10^{-4}$ and Figure 3F). Taken together, these results show that *REL* promotes the expansion and persistence of AID-imprinted B-cells in the secondary lymphoid organs.

REL-overexpressing germinal center B-cells display a competitive advantage and are prone to immunoglobulin switching.

The fluorescent markers TOM and YFP were used to define the splenic B-cell composition of RELpos (TOM+/YFP+) and RELneg (TOM+/YFP-) B-cells in REL-AID mice shortly after immunization (Figure 4A). CD95pos CD38low GC B-cells were significantly increased in TOM+ B-cells of REL-AID mice when compared to their AID-TOM control (Figure 4B). This GC B-cell fraction was specifically enriched in RELpos B-cells, reaching almost 90% of total TOM+ B-cells, even in mice with a rather low percentage of YFP+ cells among total TOM+ B-cells (Figure 4C). Indeed, the GL7 positive GC B-cell fraction was found almost exclusively in RELpos B-cells (Figure 4D). Interestingly, the increase in GC B-cells in the TOM+ fraction persisted a long time after immunization was stopped in REL-AID mice, whereas these GC TOM+ B-cells almost disappeared in AID-TOM controls (Supplemental Figure S3).

RELpos B-cell enrichment was not found for IgMpos IgDneg B-cells (Figure 4E and Supplementary Figure S4). Including switched B-cells, the IgM/IgD double negative B-cell subset was moderately increased in REL-AID mice when compared to TOM-AID controls. The enrichment in RELpos B-cells in this subset was moderate although significant (Figure 4E). But IgM/IgD double negative B-cells also contain GC B-cells that have downregulated their BCR or have a nonfunctional or damaged BCR. Thus, we also looked at the expression of the IgG1 isotype. As shown in figure 4F, although heterogeneous, percentages of IgG1 switched B-cells were increased in REL-AID mice and these IgG1 B-cells were enriched in RELpos B-cells.

REL-overexpressing B-cells are prone to plasma cell but not to memory B-cell differentiation.

Targeting plasma cells (PCs) with the CD138 marker revealed that PC differentiation was rather heterogeneous in REL-AID mice, although not significantly increased when compared to TOM-AID controls. But, almost all PCs from REL-AID mice were derived from the RELpos B-cell fraction (figure 5A).

Memory B-cells (MBCs) were defined by increased expression of the CD273 marker²⁴. Both IgM+ and IgM- MBCs were detected with this marker (Figure 5B). Levels of both IgM+ and IgM- MBCs were not significantly increased in REL-AID mice, although more heterogeneous than in AID-TOM mice. The percentages of RELpos B-cells in both MBC subsets was similar to that of RELneg B-cells (Figure 5B), indicating that *REL* was neutral on post GC MBC differentiation. Indeed, neither an increase of IgG1 MBCs nor an enrichment of RELpos B-cell in this fraction was found in REL-AID mice.

CD40 stimulation increased the ex vivo proliferation of B-cells overexpressing REL.

In parallel to REL-AID mice and by crossing REL-YFP with CD19-Cre mice, we also generated a REL-CD19-Cre mouse model. As expected, more than 80% of REL-CD19-Cre B-cells were YFP positive (Figures 6 and 7), while CD19 negative cells were not (not shown). These mice did not show any phenotype after 18 month follow-up. However, we could use this model to functionally analyze the effects of *REL* on whole CD19pos B-cells. As exemplified in Figure 6A, cell proliferation was examined by dilution of the Cell-Trace violet (CTV) marker over successive mitoses. The percentage of YFP+ B-cells remained stable over the course of the ex-vivo experiment (Figure 6A). The results presented in Figure 6B show that *REL*

overexpression alone did not play significantly on *ex-vivo* B-cell proliferation. Response to signals targeting TLR9 or TLR4 could be increased in REL-CD19-Cre B-cells, but the differences were not statistically significant when compared to controls (Figure 6B). CD40 signal appeared to weakly but consistently and significantly increase REL-CD19-Cre B-cell proliferation. REL-CD19-Cre splenic B-cells were as responsive to IL4 alone or in combination with CD40 as CD19-Cre control B-cells. Thus, at the global B-cell level, the effects of *REL* on proliferation appeared to be enhanced by CD40 stimulation.

Initially protecting cells from apoptosis, *REL* increased *ex-vivo* germinal center B-cells differentiation and plasma cell production.

In a next step we used the REL-CD19-Cre model to investigate germinal center B-cell differentiation *ex-vivo* according to the protocol developed by Nojima et al.²⁶. Purified B-splenocytes were induced for GC B-cell differentiation by contact with CD40L and BAFF-secreting fibroblasts in the presence of IL4 for four days. As shown in Figure 7A, the percentage of YFP+ REL-CD19-Cre B-cells remained constant over time, while IgD expression was lost, CD38 surface levels tended to decrease and both GL7 and CD95 GC-B-cell markers were progressively acquired, reaching a maximum at D4. Compared to their CD19-Cre control, the percentage of REL-CD19-Cre B-cells differentiating into GC B-cells was markedly increased, with the most significant difference found at D3 (Figure 7B). Regarding post-GC differentiation, the percentage of memory B-cells, either IgM positive or IgG1 switched, was similar in both CD19-Cre control and REL-CD19-Cre mice (not shown). In contrast, plasma cell production was increased in REL-CD19-Cre mice at D3 and D4, although at low percentages (figure 7C).

We then looked at apoptosis and proliferation of ex-vivo GC-differentiating B-cells. As shown in Figure 7D, the percentage of annexin V positive REL-CD19-Cre B-cells was first decreased at D1 and D2 and then increased as the cells differentiated into GCBs, exceeding those of control cells at D4. As assessed by EdU incorporation, proliferation of GC-differentiating B-cells was rather similar between control and REL-CD19-Cre mice during the first three days and increased very heterogeneously in the latter at D4 (Figure 7E).

Altogether, these results show that *REL* overexpression in B-cell favored ex-vivo GC B-cell differentiation and plasma cell production. The effects of *REL* on proliferation seemed marginal, while those on apoptosis were more consistent for the first three days of GC B-cell differentiation.

Discussion

Questioning the role of c-Rel in first steps of GC B-cell transformation, we present for the first time a dual-color mouse model, so-called REL-AID, in which a genetic event responsible for permanent REL overexpression is transiently induced in only a small fraction of the pool of B-cells irreversibly marked by AID imprinting, allowing color tracking of REL-overexpressing B-cells distinct from their REL-negative counterparts. Results clearly show that dysregulation of c-Rel in GC B-cells promotes GC B-cell expansion, favors CSR and PC differentiation and confers a long-term competitive advantage.

Recently, a mouse model with c-Rel overexpression in B-cells was reported by Kobel-Hasslacher et al.¹⁶. In this model, the *REL* transgene was under the dependence of a strong CAG promoter. *REL* overexpression was obtained in either all CD19pos or all switch-engaged GC B-cells, after breeding with CD19-Cre or C γ 1Cre mice^{23,27}. The phenotype of these mice demonstrated a positive effect of c-Rel on GC B-cell expansion, resulting in increased PC differentiation with production of autoantibodies. In comparison, we could not detect any phenotype of our REL-CD19-Cre mice. Only ex-vivo functional studies on purified B-cells revealed that c-Rel could promote GC-B cell differentiation and PC production by initially protecting GC engaged B-cell from apoptosis. Our *REL* transgene was under the control of the Rosa26 promoter, which is known to be 10 times much weaker than the CAG promoter²⁸. The absence of a *REL* phenotype in REL-CD19-Cre mice may very well be due to rather low levels of *REL* overexpression. Proliferation experiments showed a weak but significant c-Rel synergy only in presence of CD40. Like BAFF, CD40 is a potent activator of the alternative NF- κ B activation pathway³. BAFF is essential for ex-vivo GC B-cell differentiation²⁶. Invalidation of BAFF and BAFF receptors results in the rapid decline of germinal centers after antigenic

stimulation²⁹. Together with RelB, both BAFF and CD40 are also able to induce c-Rel activation^{30,31}. Overall, our results raise the question of the synergy of c-Rel and RelB in the c-Rel-dependent expansion of GC B-cells.

Since induction of *REL* in all CD19pos B-cell would not reflect the true physiopathology of REL-associated B-cell transformation, we developed the dual-color REL-AID model in an attempt to get closer to what is most likely to occur in the true life of an emerging tumoral B-cell that has recently been hit by an initial genetically transforming event such as *REL* gains in GCs. *REL* overexpression in GCB DLBCLs is directly correlated with *REL* gains but is rather modest, being about 1.5 fold-change in most cases⁷. Therefore, we first chose to keep our *REL* transgene under the control of the native Rosa26 promoter to mimic a weak but continuous deregulation of REL. Second, Cre-ert2 expression was dependent on AID regulation to mainly target the GC B-cell stage. Third, Cre-ert2 activity was very transiently induced by tamoxifen gavage together with immunization with a complex antigen. Fourth, the few RELpos B-cells generated after tamoxifen gavage remained in competition with all other *REL* unhit B-cells for a long time in the context of a complex and chronic immune response. This competition would begin within GCs and would continue later in post-GC differentiation stages. To find that the small pool of RELpos AID-imprinted B-cells was favored *in vivo* for GC reaction and then for CSR and PC differentiation is in agreement with Kobel-Hasslacher et al.¹⁶. Moreover, the results also show a clear competitive advantage in the long-term maintenance and recirculation upon and after chronic immunization for RELpos B-cells. Because *REL* was neutral on MBC differentiation in secondary lymphoid organs, this *REL* effect on the recirculating B-cells would occur later, favoring long-term survival of post-GC recirculating MBCs. In addition to highlighting the role of chronic antigenic stimulation, our results also indicate that part of this

competitive advantage may very well be related to the long-term persistence of RELpos GC B-cell production in secondary lymphoid organs.

Most B-cell transformation scenarios imply a primary event that allows escape from homeostasis and then accumulation of mutations over-time until clinical emergence of the B-cell tumor. Resulting in deregulation of Bcl2, the primary transforming event in FLs is the t(14;18)(q32;q21) translocation. These t(14;18)pos B-cells can be detected at a very low frequency in most adults. However, the vast majority of these t(14;18)pos B-cells will never transform. Clonal FL lymphomagenesis is due to the accumulation of secondary mutations such as those in CREBBP, TNFSRF14, EZH2 or KMT2D over decades²⁰. These secondary mutations are also commonly found in GCB DLBCLs with the *REL* signature⁷. By showing that the weak but continuous deregulation of *REL* favors emergence of a B-cell that will be positively selected and expanded in GCs and will have a strong long-term competitive advantage in the context of repeated immune responses, our results provide evidence for *REL* gains/amplification as a primary genetic event in the aggressive transformation of GC B cells. Consistently, and although it was only one case, one REL/AID mouse in our cohort developed an aggressive B-cell tumor with almost 100% RELpos B-cells.

Collectively, our findings suggest for the first time that genetic deregulation of c-Rel expression is most likely a primary event in the aggressive transformation of GC B-cells and raise the question of *REL*-associated secondary events for GC B-cell transformation.

Legend for figures

Figure 1: Characterization of the REL-AID mouse model

Figure 1A: Schematic representation of the REL-IRES-Yfp and tdTomato inserts into the Rosa26 locus: the *REL* sequence was placed in frame with the Internal Ribosomal Entry Site (IRES) and the coding sequence for Yellow Fluorescent Protein (YFP).

Figure 1B: Schematic diagram of the immunization protocol for analysis either shortly or long time after the end of immunizations. Blood samples were collected on D14 and then each month, always before immunization recall throughout the immunization and post-immunization period.

Figure 1C: Example of a flow cytometry biparametric YFP and tdTomato (TOM) histogram gated on live B220pos B-cells. TOM+/YFP- and TOM+/YFP+ B-cells are colored in red and green respectively. Circulating blood cells were collected from a AID-TOM (left) or a REL-AID (right) mouse one month after immunization and tamoxifen gavage. Percentages of fluorescent cells are shown in each graph.

Figure 1D: Relationship between the percentage of TOM+/YFP+ among total TOM+ B-cells (x-axis) and that of TOM+ B-cells among total B220pos B-cells (y-axis) in REL-AID mice. The correlation curve is shown in red. The value of the correlation coefficient r is shown in the graph.

Figure 2: Relationships between the kinetics of circulating TOM+ and TOM+/YFP+ with CD80 expression.

Figure 2A: Box plot of the percentage of circulating TOM+ cells in AID-TOM and REL-AID mice over time. The dashed red line indicates the end of immunization recall. The p-values of a two-way ANOVA for REL effect is shown.

Figure 2B: Relationship between the percentage of TOM+/YFP+ among total TOM+ B-cells (x-axis) and that of TOM+ B-cells among total B220pos B-cells (y-axis) in REL-AID mice at month 2 (top graph) and month 12 (bottom graph). The correlation curve is shown in red. The values of the Pearson correlation coefficient r and of its p-values are given in each graph.

Figure 2C: Distribution of the percentage of TOM+/YFP+ B-cells among total TOM+B-cells over time in REL-AID mice. The red dot represents the mouse with the highest percentage and green dot the mouse with the lowest percentage. The p-value of the one-way ANOVA is shown within the graph.

Figure 2D: CD80 expression levels in TOM+/YFP- from either AID-TOM and REL-AID as well as TOM+/YFP+ mice. Mann-Whitney test p-values are shown

Figure 3: Relationship between the levels of TOM+ and TOM+/YFP+ B-cells in secondary lymphoid organs.

Figure 3A and 3D: Schematic representation of the immunization protocol for analysis either shortly (Figure 3A) or long time (Figure 3D) after the end of immunization.

Figure 3B and 3E: Analysis of TOM+ and TOM+/YFP+ B-cells in secondary lymphoid organs shortly (Figure 3B) or long time (Figure 3E) after the end of immunization for AID-TOM control (left) and REL-AID mice (right) in the spleen (SP), in lymph nodes (LN) and in the peritoneum (IP). Top: percentage of TOM+ B-cells among total live B-cells. Bottom: percentage of TOM+/YFP+ B-cells among TOM+ B-cells. In Figure 3B, the case with a diffuse aggressive B-cell lymphoma is indicated by an arrow. P-values are shown on the top of the graph.

Figure 3C and 3E: Histological aspect of the spleen shortly (Figure 3C) or long time (Figure 3F) after the end of immunization for AID-TOM control (top) and REL-AID mice (bottom).

Figure 4: Analysis of splenic germinal center and IgG1 switched B-cells shortly after immunization

Figure 4A: Gating strategy for gating TOM+/YFP- (colored in red) and TOM+/YFP+ (colored in green) as well as germinal center B-cells (GCBs) from total live B-cells.

Figure 4B: Percentage of GCBs among TOM+ B-cells in AID-TOM control and REL-AID mice. The p-value of the Mann-Whitney test is shown.

Figure 4C: Percentage of TOM+/YFP+ B-cells in the total TOM+ (left) or in the GCB (right) fraction in REL-AID mice. Each line connects the points for one mouse. The p-value of the Wilcoxon test is shown.

Figure 4D: Example of gating on the CD38^{low}/IgD^{neg} B-cell fraction (left) showing that almost all B-cells with a CD95⁺/GL7^{high} GCB phenotype (right) are colored in green, corresponding to TOM+/YFP+ B-cell cells.

Figure 4E: Analysis of IgM^{neg}/IgD^{neg} double negative (DN) B-cells: left: example of gating on DN B-cells; middle: percentages of DN cells among total TOM+ B-cells in AID-TOM and REL-AID mice; right: percentages of TOM+YFP+ B-cells among TOM+ B-cells in the total TOM+ and in the DN B-cell fraction in REL-AID mice (each line connects the points for one mouse). The p-values of the Mann-Whitney (middle) and Wilcoxon test (right) are shown.

Figure 4F: Analysis of IgG1 switched B-cells: left: example of gating on IgG1+ B-cells; middle: percentages of IgG1+ DN B-cells among total TOM+ B-cells in AID-TOM and REL-AID mice; right: percentages of TOM+YFP+ B-cells among TOM+ B-cells in the total TOM+ and in the IgG1+ DN B-cell fraction in REL-AID mice (each line connects the points for one mouse). The p-values of the Mann-Whitney (middle) and Wilcoxon test (right) are shown.

Figure 5: Analysis of splenic plasma cells and memory B-cells shortly after immunization

Figure 5A: Analysis of plasma cells (PCs): left: example of gating on PCs; middle: percentages of PCs cells among total TOM+ B-cells in AID-TOM and REL-AID mice; right: percentages of TOM+YFP+ B-cells among TOM+ B-cells in the total TOM+ and in the PC fraction in REL-AID mice (each line connects the points for one mouse).

Figure 5B: Analysis of memory B-cells (MBCs): top left: example of CD80/CD273 biparametric histogram for IgD-/IgM+ (IgM+) and IgD-/IgM- B-cells. MBCs are CD80+/CD273+; top right: percentages of IgM- and IgM+ MBCs B-cells among total TOM+ B-cells in AID-TOM and REL-AID mice; bottom: percentages of TOM+YFP+ B-cells among TOM+ B-cells in the total TOM+ and in the IgM+ (left) and in the IgM- (right) B-cell fractions in REL-AID mice (each line connects the points for one mouse).

Figure 5C: Analysis of IgG1 switched MBCs: left: percentage of IgG1+ MBCs among total TOM+ B-cells in AID-TOM and REL-AID mice; right: percentage of TOM+YFP+ B-cells among TOM+ B-cells in the total TOM+ and in the IgG1+ MBC fraction in REL-AID mice (each line connects the points for one mouse).

ns: non-significant

Figure 6 : Ex-vivo proliferation assay for B-cells from CD19-Cre and REL-CD19-Cre mice

Figure 6A : Example of histograms for YFP (left) and Cell Trace violet (CTV, right) at D0 (grey) and D4 (red) of ex-vivo CD40 stimulation for splenic B cells from a REL-CD19-Cre mouse.

Figure 6B and 6C: Histograms showing the percentage of CTV low B-cells for CD19-Cre and REL-CD19-Cre mice in response to ODN CpG and LPS compared to no stimulation and to a control ODN (ODN ctl) (panel B) or in response to CD40, IL4, both or no stimulation (panel C).

Figure 7 : Ex-vivo germinal center B-cell and plasma cell differentiation for splenic B-cells from CD19-Cre and REL-CD19-Cre mice

Figure 7A: Example of histograms for YFP, IgD/CD38 and CD95/GL during the time course of the GC B-cell differentiation for a REL-CD19-Cre mouse; top: YFP fluorescence histograms of live B-cells from Day 1 to Day 4 showing the stability of the transgene expression; middle: IgD/CD38 biparametric histograms showing the increase in the percentage of IgDneg/CD38pos or low B-cells over time; bottom: CD95/GL7 biparametric histograms showing the increase in the percentage of B-cell with a CD95high/GL7high GCB B-cell phenotype among IgDneg/CD38pos or low B-cells.

Figure 7B: Percentages of IgDneg/CD38pos or low/ CD95high/GL7high germinal center B-cells among total B-cells from Day 1 to Day 4

Figure 7C: Percentages of plasma cells (PCs) among total B-cells from Day 1 to Day 4.

Figure 7D: Example of Viakrome_808/Annexin V biparametric histogram for a CD19-Cre and a REL-CD19-Cre mouse with percentages in each right quadrant (left) and percentages of Annexin V positive B-cells during the time course of the GC B-cell differentiation (right).

Figure 7E: Example of EdU/B220 biparametric histogram for a CD19-Cre and a REL-CD19-Cre mouse and percentages of EdU positive B-cells during the time course of the GC B-cell differentiation (right).

p-values for ANOVA are shown when significant. Multiple t-test with Holm-Sidak correction were also performed (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

References

1. Blank V, Kourilsky P, Israël A. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17(4):135–140.
2. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell.* 2017;168(1–2):37–57.
3. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280–288.
4. Tam WF, Wang W, Sen R. Cell-specific association and shuttling of IkappaBalpha provides a mechanism for nuclear NF-kappaB in B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(14):4837–4846.
5. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, et al. Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies. *J. Intern. Med.* 2017;282(5):415–428.
6. Pasqualucci L, Klein U. NF-κB Mutations in Germinal Center B-Cell Lymphomas: Relation to NF-κB Function in Normal B Cells. *Biomedicines.* 2022;10(10):2450.
7. Faumont N, Taoui O, Collares D, et al. c-Rel Is the Pivotal NF-κB Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study. *Front. Oncol.* 2021;11:638897.
8. Eluard B, Nuan-Aliman S, Faumont N, et al. The alternative RelB NF-κB subunit is a novel critical player in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2022;139(3):384–398.
9. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 2003;44 Suppl 3:S41-47.
10. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, et al. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2004;103(5):1862–1868.
11. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6(1):130–140.
12. Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, et al. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2006;97(6):499–504.
13. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood.* 1996;87(1):25–29.
14. Kober-Hasslacher M, Schmidt-Supprian M. The Unsolved Puzzle of c-Rel in B Cell Lymphoma. *Cancers.* 2019;11(7):941.
15. Damdinsuren B, Zhang Y, Khalil A, et al. Single round of antigen receptor signaling programs naive B cells to receive T cell help. *Immunity.* 2010;32(3):355–366.
16. Kober-Hasslacher M, Oh-Strauß H, Kumar D, et al. c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *J. Clin. Invest.* 2020;130(6):3270–3286.
17. Köntgen F, Grumont RJ, Strasser A, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* 1995;9(16):1965–1977.
18. Heise N, De Silva NS, Silva K, et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-κB transcription factor subunits. *J. Exp. Med.* 2014;211(10):2103–2118.
19. Kennedy R, Klein U. Aberrant Activation of NF-κB Signalling in Aggressive Lymphoid Malignancies. *Cells.* 2018;7(11):189.
20. Milpied P, Gandhi AK, Cartron G, et al. Follicular lymphoma dynamics. *Adv. Immunol.* 2021;150:43–103.

21. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 1999;21(1):70–71.
22. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 2009;10(12):1292–1299.
23. Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(6):1317–1318.
24. Tomayko MM, Steinel NC, Anderson SM, Shlomchik MJ. Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2010;185(12):7146–7150.
25. Niu H, Cattoretti G, Dalla-Favera R. BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 2003;198(2):211–221.
26. Nojima T, Haniuda K, Moutai T, et al. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2011;2:465.
27. Casola S, Cattoretti G, Uyttersprot N, et al. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(19):7396–7401.
28. Chen C, Krohn J, Bhattacharya S, Davies B. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a Φ C31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS One.* 2011;6(8):e23376.
29. Rahman ZSM, Rao SP, Kalled SL, Manser T. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2003;198(8):1157–1169.
30. Almaden JV, Liu YC, Yang E, et al. B-cell survival and development controlled by the coordination of NF- κ B family members RelB and cRel. *Blood.* 2016;127(10):1276–1286.
31. Chanut A, Duguet F, Marfak A, et al. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia.* 2014;28(4):871–879.

Figure 1. PREVAUD *et al.*

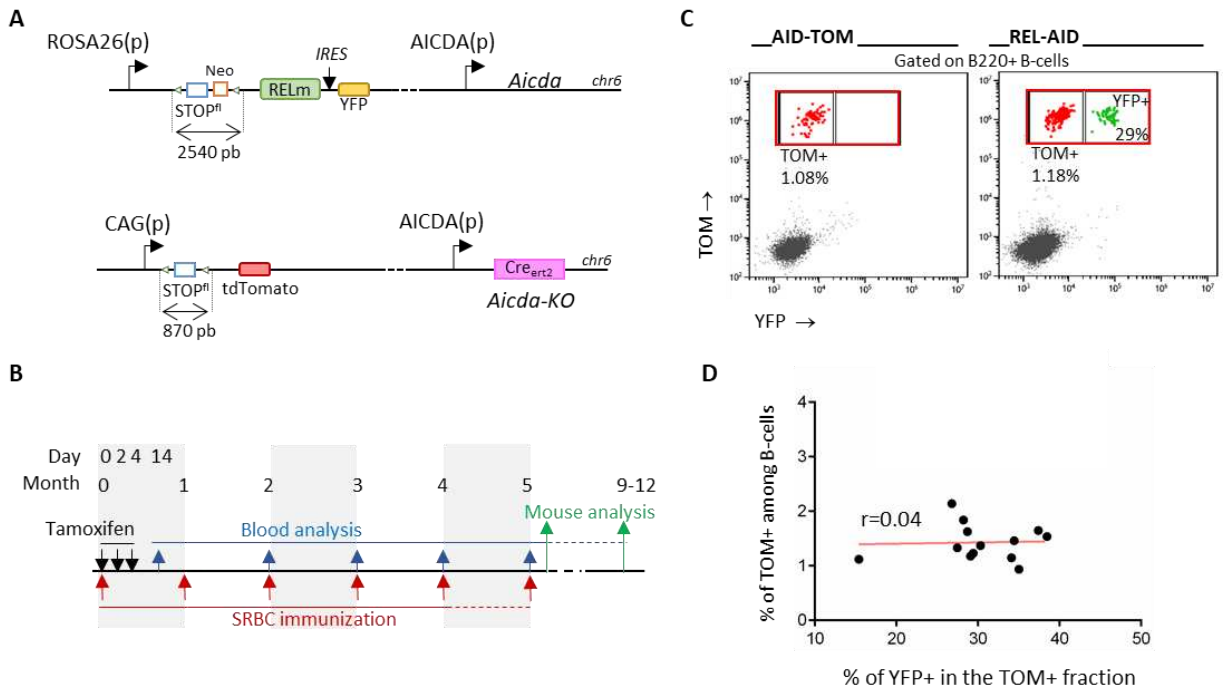


Figure 2. PREVAUD *et al.*

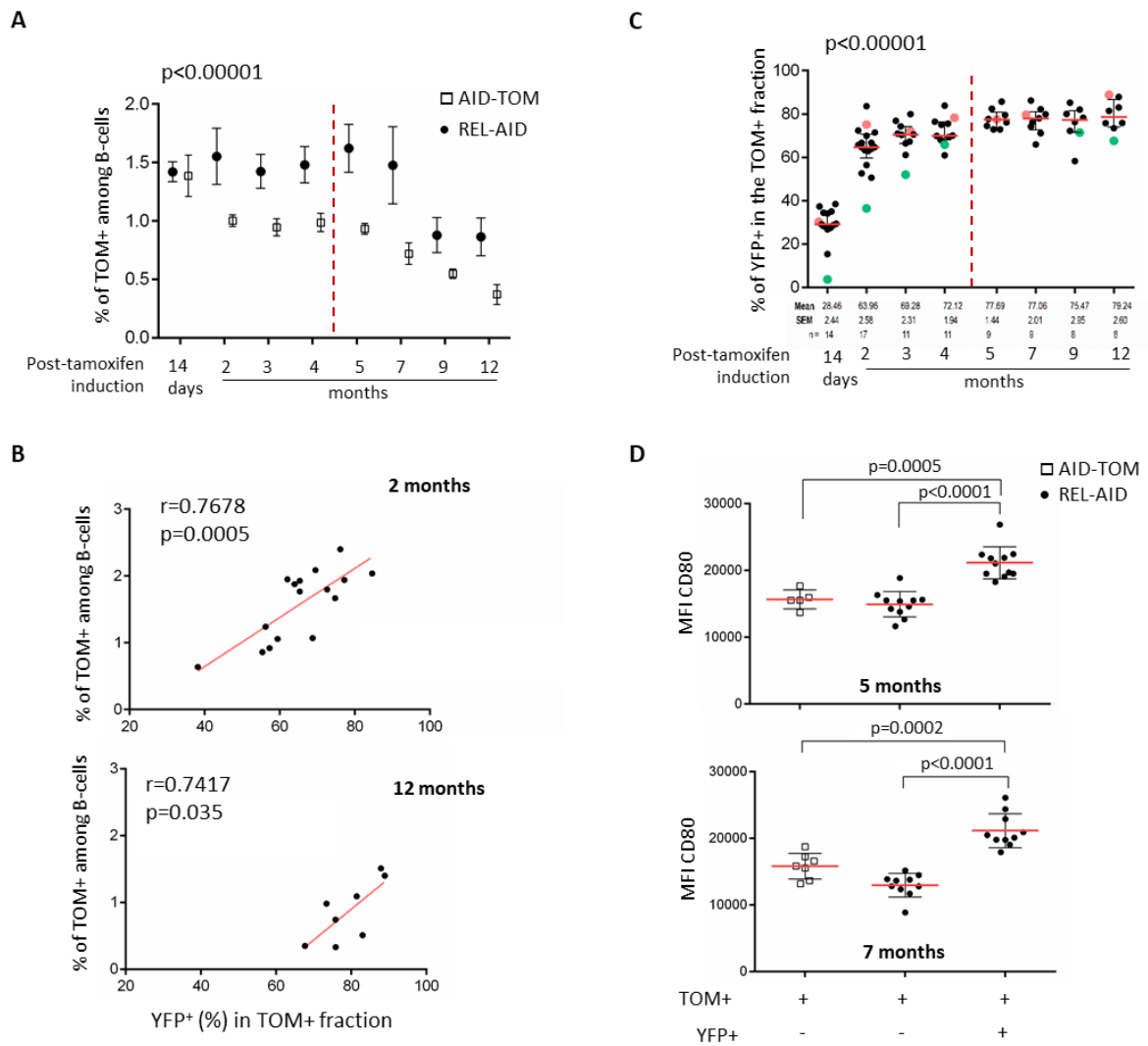


Figure 3. PREVAUD *et al.*

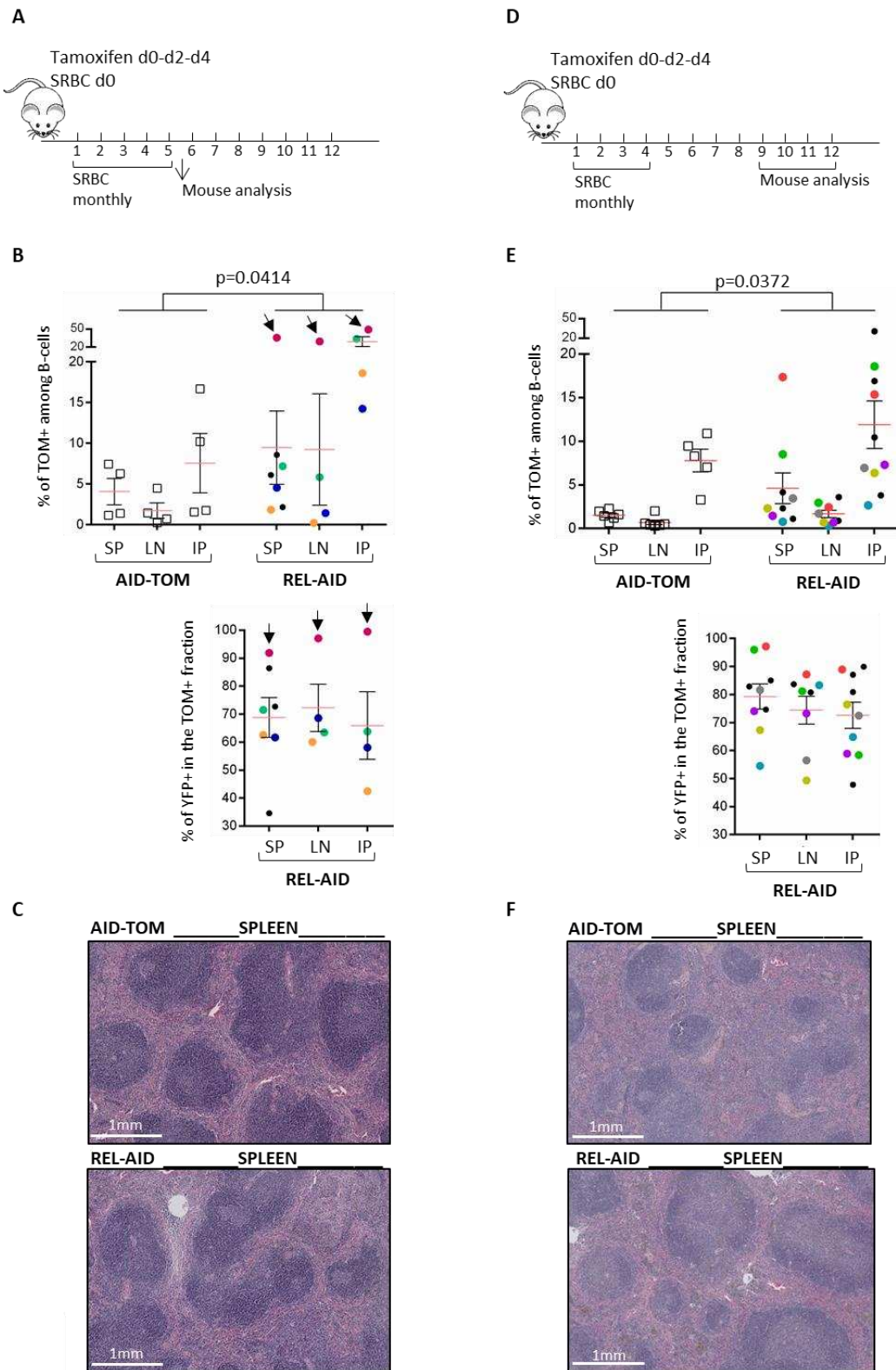


Figure 4. PREVAUD *et al.*

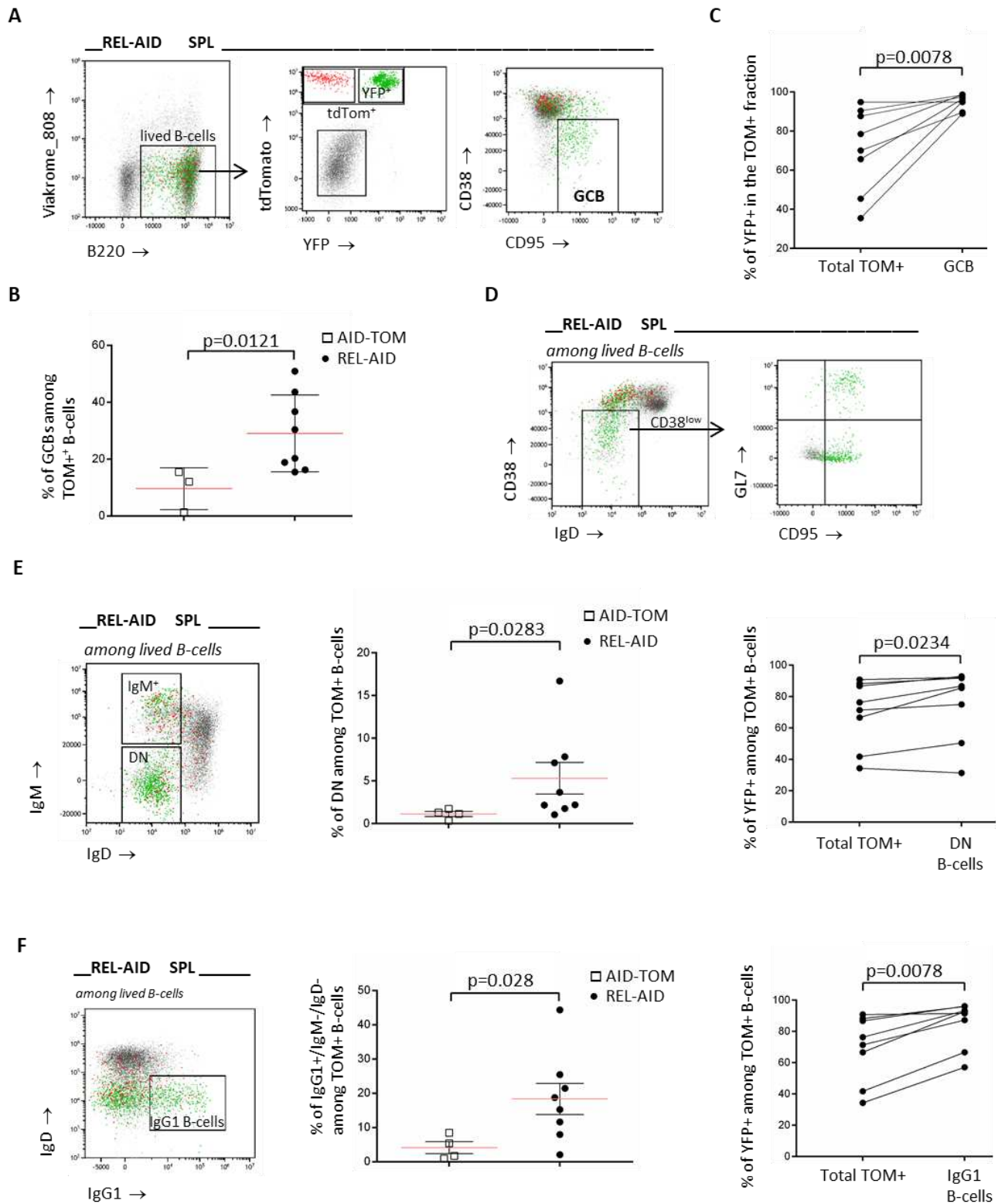


Figure 5. PREVAUD *et al.*

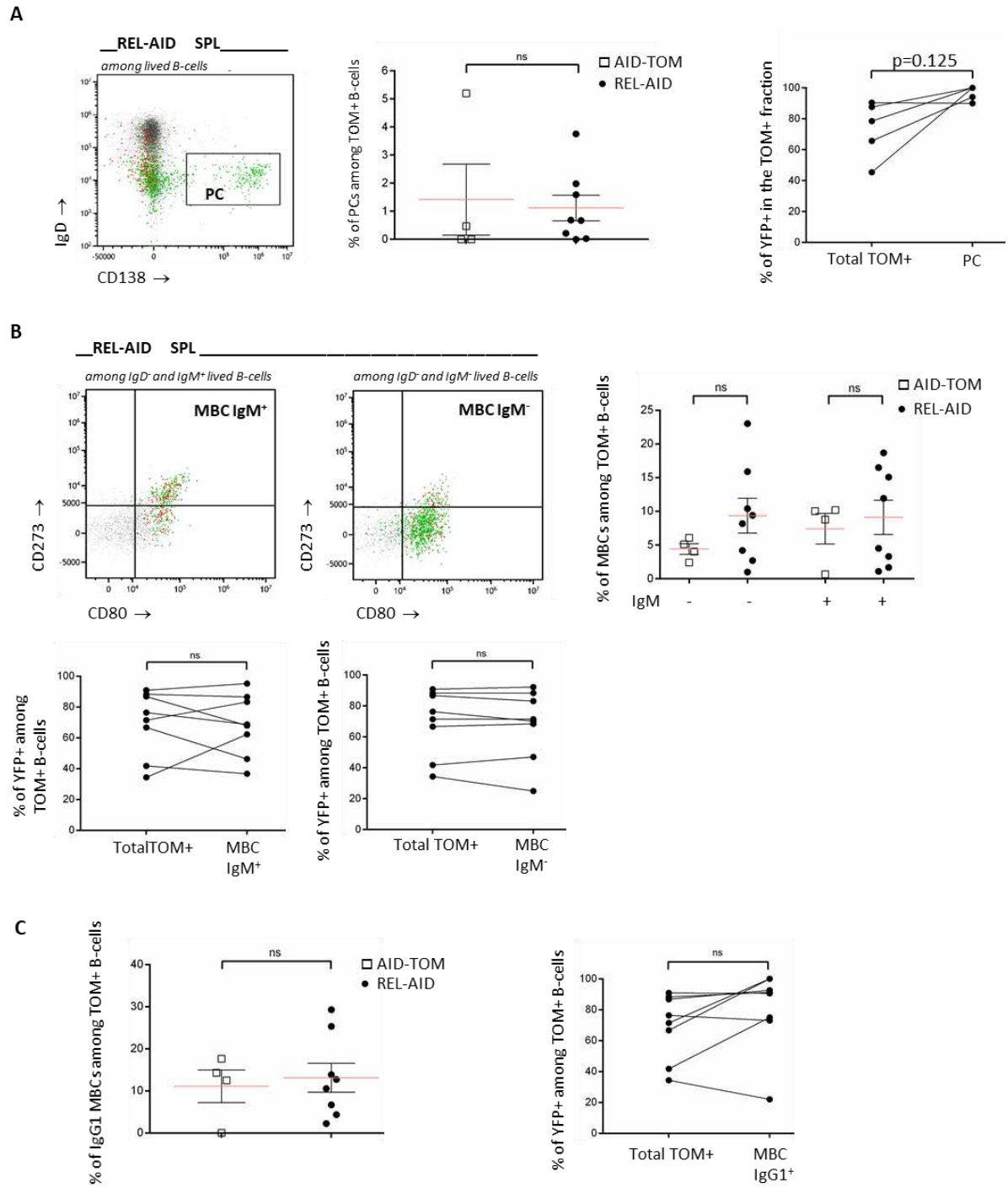


Figure 6. PREVAUD *et al.*

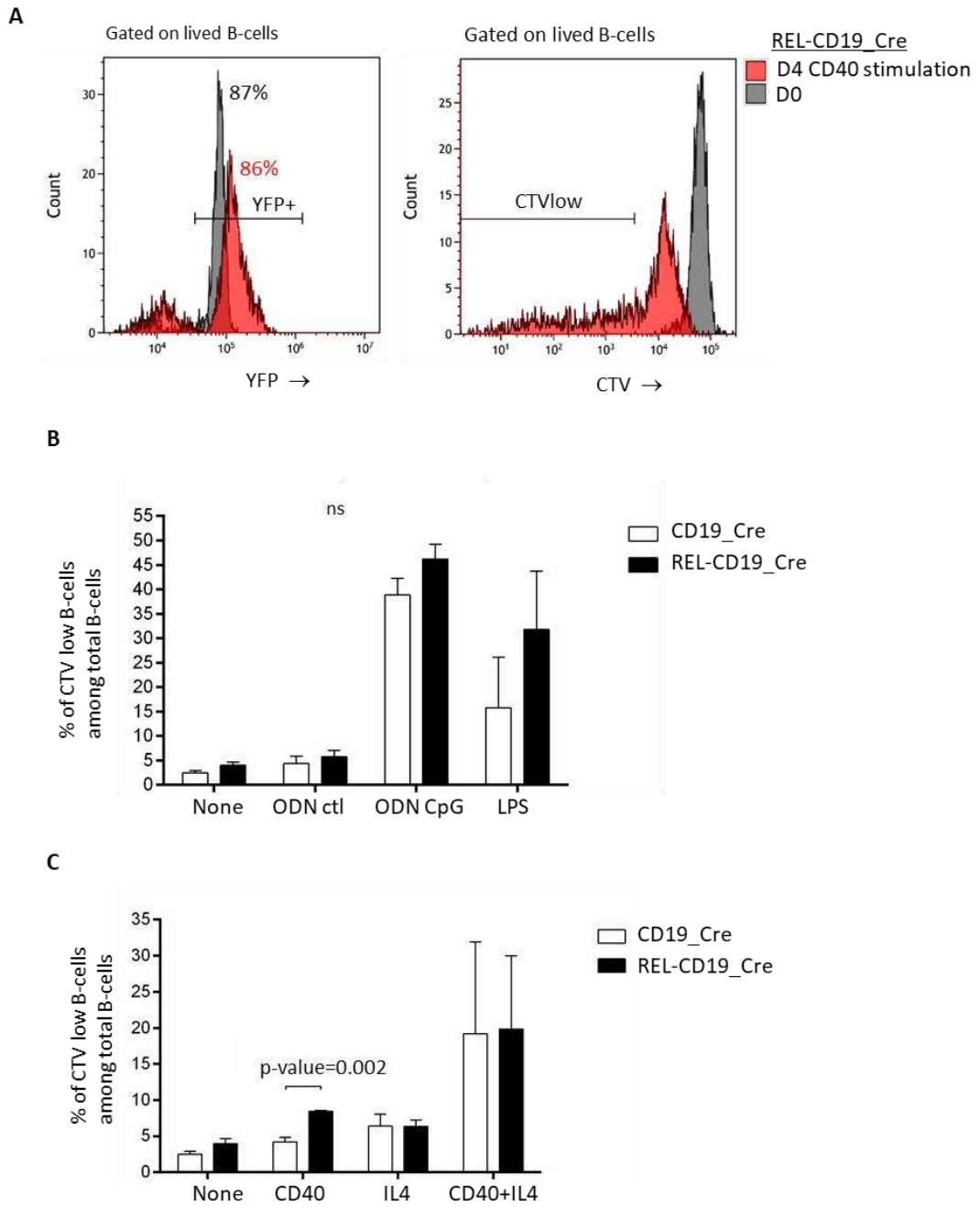
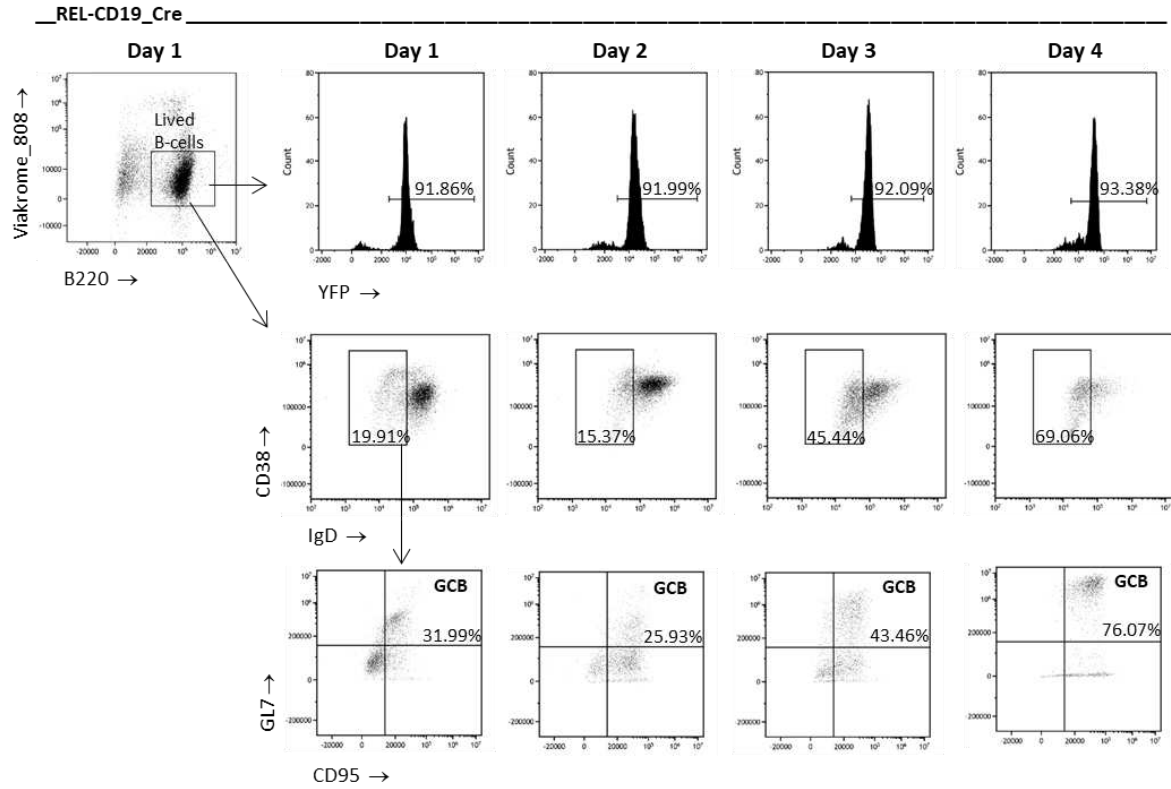
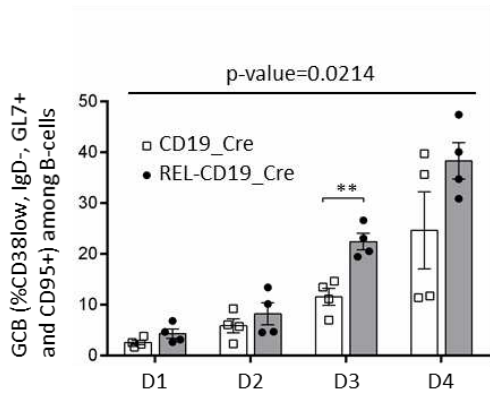


Figure 7. PREVAUD *et al.*

A



B



C

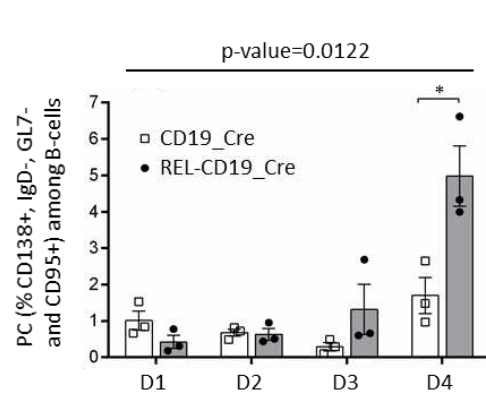
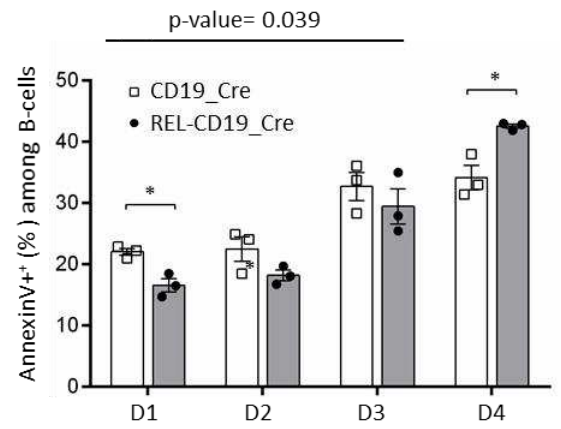
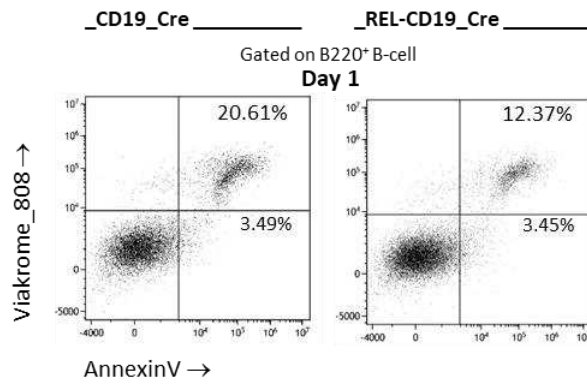
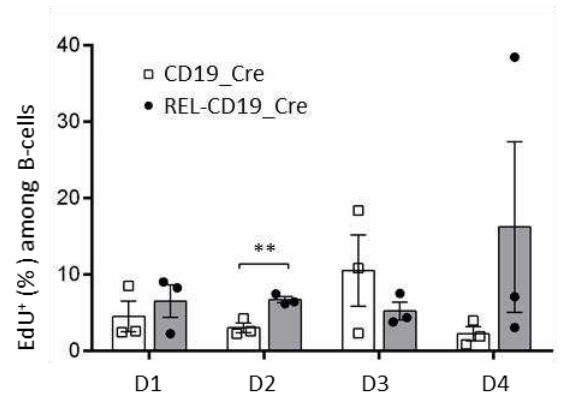
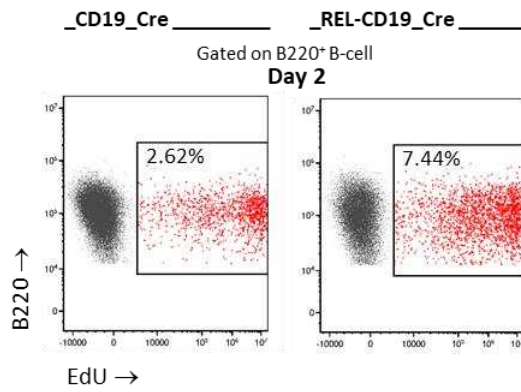


Figure 7 PREVAUD *et al.*

D



E



L'ensemble de ces résultats nous a donc permis d'obtenir les premières pistes de compréhension de c-Rel par le biais de sa surexpression *in vitro* et l'établissement de nos modèles murins de surexpression conditionnelle dans tous les B (REL-CD19-Cre) et les GCB (REL-AID).

Mais, il est important de mentionner ici que le seul évènement mutationnel engendré dans nos modèles, qu'ils soient REL-CD19-Cre ou REL-AID, est la surexpression de c-Rel. Or, nous avons pu voir au travers de l'introduction et du papier de Faumont et al (*Faumont et al.2021*) qu'il est rarement possible qu'une seule mutation puisse engendrer une cascade oncogénique et un processus de lymphomagenèse. Il faut donc plusieurs évènements oncogéniques qui coopèrent. Vous trouverez les perspectives de ce travail dans le Chapitre Discussion qui suit.

En juin 2022, nos résultats préliminaires ont été présentés à la session poster du congrès de l'EHA (EHA European Haematology Association) à Vienne (Autriche) du 9 au 12 Juin.

P1285 IN VIVO IMPACT OF ABERRANT OVEREXPRESSION OF C-REL NF- κ B SUBUNIT IN GERMINAL CENTER B-LYMPHOCYTES: A TUMOR ONCOGENIC EVENT IN GCB-DLBCLs

Topic: 20. Lymphoma Biology & Translational Research

Léa Prévaut¹, Christelle Vincent-Fabert¹, Jean Feuillard¹, Nathalie Faumont¹

¹ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR7276/ANRSERM1262), University of Limoges, Limoges, France

Background:

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are the most NF- κ B-related aggressive non-Hodgkin's lymphomas. DLBCLs are clinically, molecularly and genetically heterogeneous, suggesting different oncogenic mechanisms. Gene-expression profiling studies led to the proposal of two main cell-of-origin molecular subtypes known as germinal center B-cell-like (GCB) DLBCLs, and activated B-cell like (ABC) DLBCLs. With the Lymphoma Study Association LYSA, we previously published that strong c-Rel DNA-binding activity was mostly found in GCBs and was associated with increased *REL* mRNA expression. These cases with both overexpression of *REL* mRNA and c-Rel related gene expression profile were correlated with various recurrent GCB-DLBCLs genetic events, including *REL* gains, *BCL2* translocation, *MEF2B*, *EZH2*, *CREBBP*, and *TNFRSF14* mutations and with the EZB GCB genetic subtype.

Aims: We propose that c-Rel is a major oncogene of GCB-DLBCLs. We speculate that c-Rel confers a selective advantage in the germinal center (GC)-specific environment. We wish to study the consequences of aberrant overexpression and activation of c-Rel *in vivo* that could promote tumorigenesis in DLBCL precursor cells by disrupting the normal dynamics of B-cell development in the GC.

Methods: We have generated the fl_STOP-REL | AID_Cre-ert2 mouse model: the murine *REL* transgene preceded by a STOP-Neomycin cassette flanked of loxP sites was introduced in Rosa26 locus on chromosome 6. The *REL* transgene is followed by an IRES to allow YFP marker concomitant expression. To reach GC B-cell specific expression, we used AID_Cre-ert2 mice: the Cre-ert2 transgene was at the *AICDA* gene locus on chromosome 6. On the same chromosome, the tdTomato marker preceded by a STOP cassette flanked by loxP sites was introduced at the Rosa26 locus. A pool of *REL* overexpressing GC B-cell was generated after tamoxifen administration and T-cell-dependent antigen stimulation with sheep red blood cells (SRBC). The fate of these YFP and tdTomato positive GC B-cells was followed over-time until 8 months. The first four months, a SRBC immune booster was performed to maintain the GCs.

Results:

As expected, our model fl_STOP-REL | AID_Cre-ert2 (*i.e.* REL mice) allowed for *in vivo* competition between c-Rel overexpressing (tdTomato+/YFP+) and normal (tdTomato+/YFP-) GC B-cells. In blood, the percentage of YFP positive B-lymphocytes among the tdTomato positive cells was increased over-time: 30% at 14 days, 65% at 2 months and about 80% at 8 months. From blood, spleen and lymph nodes, phenotyping analysis by flow cytometry of REL/YFP positive B-cells indicated an activated profile compared to normal GC-derived B-cells: CD19+, IgM+, IgD-, CD21+, CD80+, and B220low. At 8 months after generation of GC B-cells pool, approximately 3-5% of B-cells were tdTomato and YFP positives in spleen of REL mice, whereas tdTomato positives cells in control mice were rare hardly detectable (less than 0.8%). Altogether, our result indicated that c-Rel reprograms B-cell to be activated and to better survive *in vivo* for very long time.

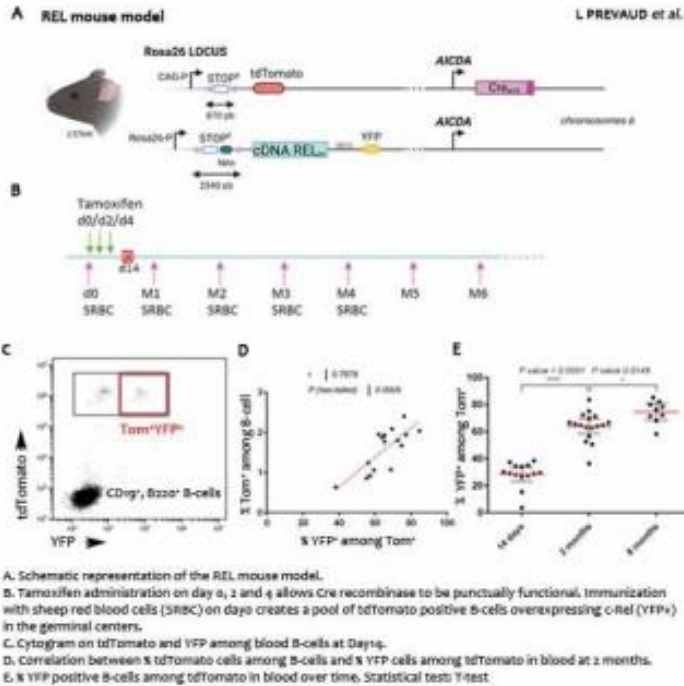
Image:

Copyright Information: (Online) ISSN: 2572-9241

© 2022 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the European Hematology Association. This is an open access Abstract Book distributed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) which allows third parties to download the articles and share them with others as long as they credit the author and the Abstract Book, but they cannot change the content in any way or use them commercially.

Abstract Book Citations: Authors, Title, HemaSphere, 2022;6:(S3):pages. The individual abstract DOIs can be found at <https://journals.lww.com/hemasphere/pages/default.aspx>

Disclaimer: Articles published in the journal HemaSphere exclusively reflect the opinions of the authors. The authors are responsible for all content in their abstracts including accuracy of the facts, statements, citing resources, etc.



Summary/Conclusion:

We bring strong experimental arguments showing that increased c-Rel expression in GC B-cell favors their survival for several months, and would thus be a primary event. We suspect that additional oncogenic events are probably needed for tumor clonal expansion such as *BCL2*, *EZH2*, *CREBBP*, *TNFRSF14* and/or c-Myc dysregulation.

Copyright Information: (Online) ISSN: 2572-9241

© 2022 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the European Hematology Association. This is an open access Abstract Book distributed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) which allows third parties to download the articles and share them with others as long as they credit the author and the Abstract Book, but they cannot change the content in any way or use them commercially.

Abstract Book Citations: Authors, Title, HemaSphere, 2022;6:(S3):pages. The individual abstract DOIs can be found at <https://journals.lww.com/hemasphere/pages/default.aspx>


Disclaimer: Articles published in the journal HemaSphere exclusively reflect the opinions of the authors. The authors are responsible for all content in their abstracts including accuracy of the facts, statements, citing resources, etc.

Downloaded from https://journals.lww.com/hemasphere by IP: 130.141.14.14 on 04/04/2023

Enfin, j'ai contribué à la publication du Pr Ahmad Oulmouden (Thèse D Ibrahim en 2022). Ma contribution dans ce travail a consisté à transmettre mon expertise sur les analyses de souris. Ce travail décrit cinq transcrits du gène MYC dans les tumeurs de type Burkitt du modèle murin λ Myc, dont le transgène est la t(8;22) issue de la lignée cellulaire humaine de lymphome de Burkitt BL60 (Biomolécules 2022 ; (Ibrahim et al., 2022)). Ces cinq transcrits sont corrélés à la production de c-Myc2 et de c-MycS, et à la perte de c-Myc1. Nous pensons que cette caractérisation complète des transcrits du gène MYC dans les tumeurs pourrait aider au développement de stratégies ciblées pour réduire l'expression des formes oncogènes de c-Myc.

Article

Alternative *c-MYC* mRNA Transcripts as an Additional Tool for c-Myc2 and c-MycS Production in BL60 Tumors

Dina Ibrahim ¹, Léa Prévaud ¹, Nathalie Faumont ¹, Danielle Troutaud ¹, Jean Feuillard ¹, Mona Diab-Assaf ² and Ahmad Oulmouden ^{1,*}

¹ CNRS UMR-7276, INSERM U1262, CRIBL, Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, University of Limoges, 87036 Limoges, France; dina.16.ibrahim@hotmail.com (D.I.); lea.prevaud@unilim.fr (L.P.); nathalie.faumont@unilim.fr (N.F.); danielle.troutaud@unilim.fr (D.T.); jean.feuard@unilim.fr (J.F.)

² Department of Sciences, Lebanese University Fanar, Beirut 1500, Lebanon; mdiabassaf@ul.edu.lb

* Correspondence: ahmad.oulmouden@unilim.fr

Abstract: While studying c-Myc protein expression in several Burkitt lymphoma cell lines and in lymph nodes from a mouse model bearing a translocated *c-MYC* gene from the human BL line IARC-BL60, we surprisingly discovered a complex electrophoretic profile. Indeed, the BL60 cell line carrying the *t(8;22) c-MYC* translocation exhibits a simple pattern, with a single c-Myc2 isoform. Analysis of the *c-MYC* transcripts expressed by tumor lymph nodes in the mouse $\lambda c-MYC$ (*A^{vy/a}*) showed for the first time five transcripts that are associated with *t(8;22) c-MYC* translocation. The five transcripts were correlated with the production of c-Myc2 and c-MycS, and loss of c-Myc1. The contribution of these transcripts to the oncogenic activation of the *t(8;22) c-MYC* is discussed.

Keywords: lymphoma cell lines; lymph nodes; c-Myc protein; BL60 cell line



Citation: Ibrahim, D.; Prévaud, L.; Faumont, N.; Troutaud, D.; Feuillard, J.; Diab-Assaf, M.; Oulmouden, A. Alternative *c-MYC* mRNA Transcripts as an Additional Tool for c-Myc2 and c-MycS Production in BL60 Tumors. *Biomolecules* **2022**, *12*, 836. <https://doi.org/10.3390/biom12060836>

Academic Editors: Thomas E. Witzig, Jithma P. Abeykoon, Saurabh Zanwar and Xavier Andrade-Gonzalez

Received: 18 April 2022

Accepted: 11 June 2022

Published: 16 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The human *c-MYC* proto-oncogene is involved in the control of many cellular processes including cell growth and apoptosis [1]. In normal cells, most transcripts of the human proto-oncogene *c-MYC* start at alternative promoters P1 and P2 and encode three proteins designated c-Myc1 (67 kDa), c-Myc2 (64 kDa), and c-MycS (55 kDa) [2–4]. These three isoforms arise by alternative initiation of translation starting at three different in-frame codons: a non-canonical CUG for c-Myc1, an AUG located 15 codons downstream for c-Myc2 [2], and an AUG 100 codons further downstream for c-MycS [3]. The resulting proteins contain the same carboxy-terminal domain but differ in their N-terminal regions. A third promoter (P3) within the first intron has also been described [5]. P3 promoter transcriptional activity leads to an mRNA that lacks the N-terminal encoding sequence (15 amino acids) that is specific to c-Myc1. Therefore, the specific function of each of the c-Myc proteins lies in their N-terminal region. The ability to express at least three amino-terminally unique forms of the c-Myc protein seems important for the normal function of c-Myc in cell growth control. Indeed, c-Myc1 and c-Myc2 possess different transactivation efficiencies at the non-canonical CCAAT/enhancer-binding protein-binding site [6]. Furthermore, c-Myc2 is predominant in growing cells while c-Myc1 is preferred as cells approach high-density growth arrest [7]. In addition, c-Myc1 exhibits a strong induction of apoptosis compared to c-Myc2. c-MycS, which is transiently expressed during rapid cell growth [3], lacks the first 100 amino acids containing two phosphorylation sites (Thr58 and Ser62) that are involved in the stability of c-Myc proteins to proteasomal degradation. Mutations of these sites are often linked to B-cell lymphomas and are correlated with reduced apoptotic potential [8]. In normal mammalian cells, these c-Myc isoforms do not accumulate singly but in specific combinations or ratios that are characteristic of a

given cell status. Therefore, imbalanced expression of the different c-Myc proteins directly contributes to the loss of cell growth control that is associated with tumor development [7].

During B-cell maturation, the IG loci (IGH, IGK, and IGL) undergo sequential rearrangements orchestrated by several B-cell-specific enhancers. Their activity allows proper B-cell differentiation and secretion of high affinity antibodies. However, the activity of the enhancers can be hijacked, leading to B-cell lymphomas. Indeed, illegitimate recombination outside the IG loci can lead to the deregulation of proto-oncogenes such as *c-MYC*. Several recurrent recombinations involving the IG and *c-MYC* loci have been described in B-cell malignancies [9]. Among the mechanisms facilitating the recombination between the IG and *c-MYC* loci is their spatial proximity in human B-cell nuclei [10].

In Burkitt's lymphoma (BL) cells that have a *c-MYC* chromosomal translocation to one of the immunoglobulin (IG) loci on chromosomes 2, 14, or 22, the transcription of a *c-MYC* proto-oncogene is characterized by preferential transcription from the *c-MYC* promoter P1 [11]. Shifted promoter P2 to P1 leads to a change in the c-Myc1/c-Myc2 ratio that is often observed in human tumors cell lines [12]. In most cases, only c-Myc2 was detected with little or no c-Myc1. Several transgenic mouse models were generated to drive *c-MYC* expression throughout B-cell development under the control of different IG enhancers, in order to mimic the IG-*c-MYC* translocation [13]. The λ c-*MYC* mouse model bearing a translocated *c-MYC* gene from the human BL line IARC-BL60 (Figure 1) exhibits aggressive lymphomas with striking similarities to human BL [14]. It was suggested that the mutation within the 5' sequence and promoter shift from P2 to P1 leads to an unbalanced expression of the different c-Myc proteins in BL60. Indeed, BL60 exhibits an increased amount of c-Myc2 and fails to synthesize the detectable levels of c-Myc1 as assessed by Western blot [2,15].

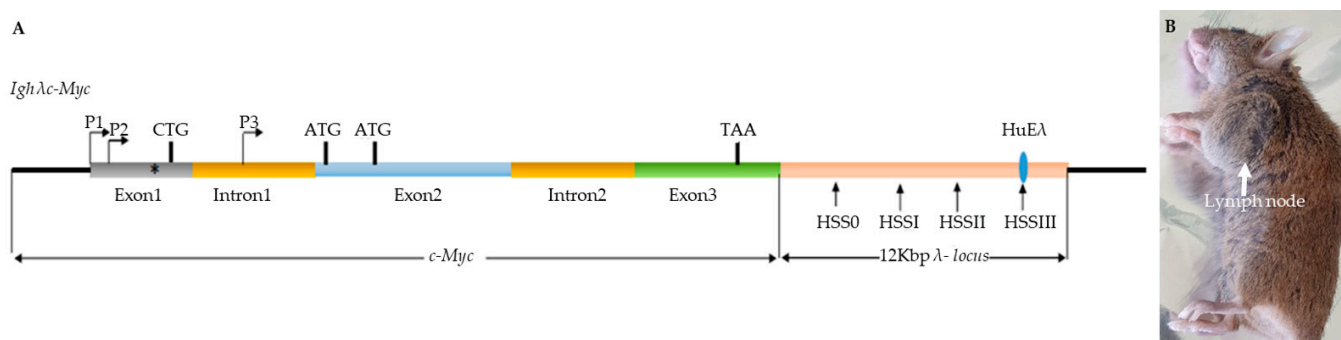


Figure 1. (A) Structure of the λ c-*MYC* transgene; (B) carried by the λ c-*MYC* ($A^{vy/a}$) model mouse of Burkitt's lymphoma. Horizontal arrows indicate the two *c-MYC* promoters, P1 and P2, located in the first noncoding exon. Vertical arrows indicate the locations of the four previously defined [14] DNaseI-hypersensitive sites (HSS) in the IglL; CTG, ATG, and ATG shown represent the previously described translation initiation sites for c-Myc1, c-Myc2, and c-Myc3, respectively. Diagram is not to scale. *: PvuII mutation.

Here, we report for the first time that tumors from lymph nodes of λ c-*MYC* ($A^{vy/a}$) mice exhibit five transcripts as new tools to exacerbate the imbalanced expression of c-Myc proteins that may explain the aggressive lymphomas in the λ c-*MYC* ($A^{vy/a}$) mouse model.

2. Materials and Methods

2.1. Mouse Models

λ c-*MYC* (a/a) mice on a C57BL/6 background were kindly provided by Pr. Georg BORNKAMM (Helmholtz Center, Munich, Germany). The λ c-*MYC* ($A^{vy/a}$) mouse model that was used in this work develops a human Burkitt-like lymphoma that is derived from crossing λ c-*MYC* (a/a) mice with Yellow mice ($A^{vy/a}$). A^{vy} mice were kindly provided by Dr. David SKAAR (Department of Biological Sciences, Centre for Human Health and the

Environment, North Carolina State, University, Raleigh, NC, USA) for epigenetic studies. All animal experiments and protocols were conducted in accordance with the European guidelines and regulations for animals used for scientific purposes, implemented in France as follows “Décret n°2012-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques”. Considerable efforts were made to minimize the number of animals that were used and to ensure optimal conditions for their well-being and welfare before, during, and after each experiment.

2.2. Cell Lines

Burkitt’s cell lines that were used in this work (BL41 (RRID:CVCL_1087), BL2 (RRID:CVCL_1966) and P3HR1, RAJI, and Namalwa) were kindly provided by Dr Sylvie Ranger-Rogez [16], cultured from cryopreserved cells, in RPMI- 1640 medium that was supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin (100 µg/mL), 1% streptomycin (100 µg/mL), L-Glutamine, sodium pyruvate, and vitamins. All the cells were cultured in a humidified chamber at 37 °C and 5% CO₂. They were not stored beyond the 35th passage. The cell pellets were washed with PBS (phosphate-buffered saline) twice and then used for either RNA or protein extraction.

2.3. RNA Extraction

RNA was prepared using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Les Ulis, France) according to the manufacturer’s instructions and treated with DNase I by using RNase free DNase set (Qiagen).

2.4. Identification of 5’UTR, 3’UTR and Full-Length of cDNA

The SMARTer RACE 5’/3’ Kit (Takara Bio, Inc. Mountain view, CA 94043 USA), Catalog no 634860) was used to perform both 5’- and 3’-rapid amplification of cDNA ends (RACE) according to the manufacturer’s instructions. Briefly, 1µg of total RNA (from lymph node tumors or cell lines) was used for 5’-RACE- Ready cDNA and 3’-RACE-Ready cDNA. Primer pairs P5’UTR1/UPM (Universal Primer A Mix) and P5’UTR2/UPM were used for PCR amplification using 5’-RACE-Ready cDNA as template to obtain 5’UTR, P3’UTR1/UPM was used to obtain 3’UTR by PCR amplification using 3’-RACE-Ready cDNA as template. By cloning and sequencing (BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit—Thermo Fisher Life technologies SAS Courtaboeuf Cedex/Villebon sur Yvette, France) the 5’ and 3’ UTRs, we designed specific primers to obtain full-cDNA and the corresponding mRNA structure. All the primers that were used in this work are listed in Table 1. PCR amplification was performed as follows: denaturation 2 min at 94 °C, 35 cycles (94 °C 15 s, 61 °C 15 s, 72 °C 1 min), 72 °C 2 min.

Table 1. Primers (P) that were used to obtain 5’UTR, 3’UTR and total length cDNAs of *c-MYC* transcripts or only open reading frames (ORFs) are indicated. The underlined sequences CATATG of Orf-c-MycS, present in all of-c-Myc, corresponds to NdeI restriction sites; the underlined sequence of Orfs corresponds to XhoI restriction site; CTG and ATG: Translation start codons; TTA: reverse complement Stop Codon.

Primer (P)	5’ to 3’ Sequence	Localisation	Use For
P5’UTR1	CTGGTTTTCCACTACCCGAAA	Exon 1	5’UTR Amplification
P5’UTR2	CGTTGAGGGGCATCGTCGCGG	Exon 2	5’UTR Amplification
P3’UTR1	CTACGGAACTCTTGTCGTAA	Start at the End of the Last Exon	3’UTR Amplification
PFull1	GACCCCGAGCTGTGCTGCTC	Start at P1:+1	Full-Length cDNA
PFull2	GGGAACAGCCGAGCGGAGGG	Start at P3:+1	Full-Length cDNA
PFull3	TTACGCACAAGAGTCCGTAG	Start at the End of the Last Exon	Full-Length cDNA

Table 1. *Cont.*

Primer (P)	5' to 3' Sequence	Localisation	Use For
PFull4	GGAGATAGTGGGGCTCAGAGC	Start at P?:+1	Full-Length cDNA
Orf-c-Myc1	ATCATATGCTGGATTTTTTCGGG	CTG Initiation Codon	Full-Length Orf-c-Myc1
Orf-c-Myc2	ATCATATGCCCTCAACGTTAGCT	ATG Initiation Codon	Full-Length Orf-c-Myc2
Orf-c-MycS	ATCATATGTTGACCGAGCTGCTG	ATG Initiation Codon	Full-Length Orf-c-MycS
Orfs	ATCTCGAGTTACGCACAAGAGTTC	TTA Stop Codon	Reverse for all Orfs

2.5. *In Vitro* Expression of *c-Myc1*, *c-Myc2* and *c-MycS* Reading Frames

Reading frame sequences encoding each protein (Figure S1) were amplified by PCR (as described above) using primer pairs that are described in Table 1 and cloned in the pT7CFE1 expression vector (Figure S2). *In vitro* transcription and translation were performed according to manufacturer's instruction (pT7CFE1-CHis Vector for Mammalian Cell- Free Protein Expression; Thermo Fisher).

2.6. Protein Extraction and Western Blot

Fresh or frozen animal tissues (30 mg) were dissected on ice. 2×10^6 cells (extracted tissues or cell culture) were suspended in 50 μ L RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay; BioRad) lysis buffer containing 200 mM PMSF (Alpha-Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, serine protease inhibitor), 100 mM sodium orthovanadate, and a protease inhibitor cocktail (Santa-Cruz Biotech). Lysis was performed on ice for 30 min. The soluble protein fraction was recovered after centrifugation at 13,000 rpm at 4 °C for 15 min. The proteins were assayed by the Bradford method. Then, the proteins that were extracted or *in vitro* synthesized proteins were denatured at 95 °C for 3–5 min in the presence of β -mercaptoethanol and Laemmli blue.

Equal amounts of denatured proteins (30 μ g/lane) were separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membrane. Nonspecific binding sites were blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.1% Tween-20. After overnight incubation at 4 °C with specific primary Ab (9E10, dilution 1/200, sc-40 Santa Cruz Biotechnology 92000, Nanterre, France), membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Ab (dilution 1/1000, sc-2357 Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature and revealed by an enhanced chemiluminescent detection method (Immubilon Western, Millipore, Merck Millipore Saint Quentin en Yvelines, France). Protein-loading control was performed with GAPDH.

3. Results

3.1. *c-MYC* Gene Translocation and Synthesis of *c-Myc* Proteins in Burkitt Lymphomas

In our λc -MYC ($A^{vy/a}$) model mouse (Figure 1) of Burkitt lymphomas [14], we repeatedly obtained a complex electrophoretic pattern on Western blot, notably in lymph node tumors. We consistently observed two bands in those tumors that could correspond to *c-Myc2* and *c-MycS* with an apparent molecular weight of 64 kDa and 55 kDa, respectively, in addition to a 45 kDa band (Figure 2A). The latter, in addition to *c-Myc1* and *c-Myc2*, has been described in several human and avian cell lines [3]. All Burkitt lymphoma cell lines that were studied exhibited doublet bands (Figure 2B): *c-Myc2* (64 kDa) and probably its phosphorylated [2] form (65 kDa). Burkitt lymphoma cell lines are considered to express only *c-Myc2* [2]. Since we were unable to explain the presence of the other bands (Figure 2A,B), we performed a control test to detect *c-Myc* proteins.

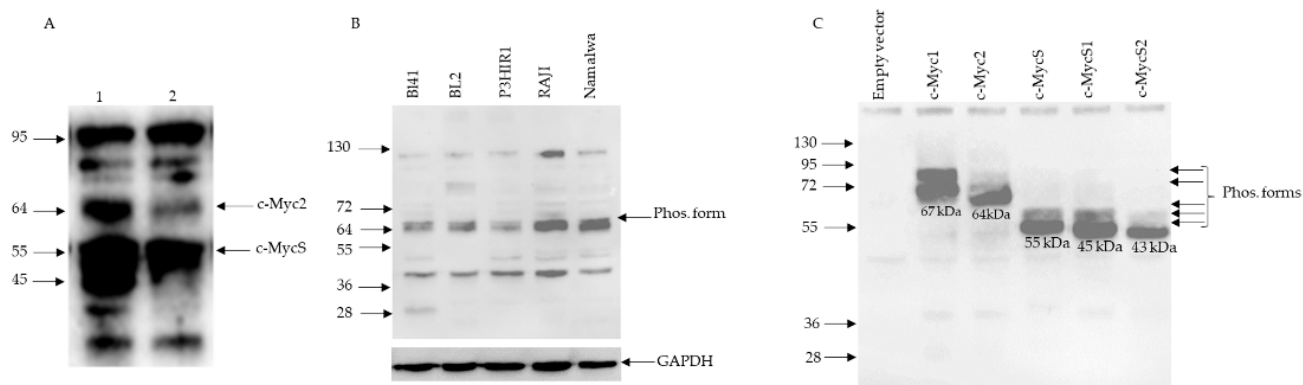


Figure 2. Analysis of the migration profile of c-Myc proteins by Western blot using the monoclonal antibody 9E10 directed against the conserved C-terminal part of c-Myc1, c-Myc2, c-MycS, and two other potential reading frames that were not previously described and named here c-MycS1 and c-MycS2 (Figure S1). (A) Typical results were obtained from cell extracts that were prepared from lymph nodes from two λc -MYC ($A^{vy/a}$) mice (lane 1, lane 2). (B) Results that were obtained from extracts that were prepared from BL cell lines. (C) Electrophoretic pattern of c-Myc1, c-Myc2, c-MycS, c-MycS1, and c-MycS2 proteins, obtained in vitro by transcription and translation of the open reading frames (Orf-c-Myc1, Orf-c-Myc2, Orf-c-MycS, Orf-c-MycS1, and Orf-c-MycS2) cloned separately into the pT7CFE1 vector (Figure S2). The apparent molecular weight of the different bands is shown on the left; Empty vector: Negative control; Phos. Form: Phosphorylated form; GAPDH: loading control.

3.2. c-Myc Protein Production by Cell-Free Translation of a Single Cloned Reading Frame

The reading frames encoding c-Myc1, c-Myc2, or c-MycS plus two other reading frames downstream (Figure S1) from the c-MycS translation initiation site (named c-MycS1 and c-MycS2) were cloned into the pT7CFE1 vector (Figure S2), and the corresponding mRNA was translated in vitro using a mammalian in vitro translation system based on HeLa cell lysates. This experimental approach yielded the proteins that were detected in Figure 2C. In each case, significant bands with apparent molecular weights of 67 kDa (c-Myc1), 64 kDa (c-Myc2); 55 kDa (c-MycS), 45 kDa (c-MycS1), and 43 kDa (c-MycS2) were obtained. Minor bands corresponding to the phosphorylated forms [2] were also detected. However, c-MycS, c-MycS1, and c-MycS2 lack (Figure S1) the first 100, 109, and 133 amino acids, respectively, which contain two phosphorylation sites. Moreover, other phosphorylation sites have been described in the C-terminal region of the c-Myc proteins [17]. This result validates the capability of the 9E10 antibody used against the C-terminal region to detect c-Myc protein isoforms with an unaltered C-terminal region, and to some extent the identity of the bands that were described in Figure 2A,B. Of note, c-Myc1 (67 kDa) was undetectable in both lymph nodes (this work) and Burkitt's lymphoma cell lines (this work and) [2].

3.3. c-MYC Transcripts in Lymph Nodes from λc -MYC Mice

The λc -MYC mouse model was obtained by transgenesis using a 12 Kbp DNA fragment (Figure 1A) from the c-MYC translocation $t(8;22)$ of BL60 cell line [11,14]. As the electrophoretic profile of c-Myc proteins in tumors from lymph nodes from λc -MYC ($A^{vy/a}$) mice was no longer similar to that which was described for the BL60 line, with c-Myc2 but also c-MycS, and c-MycS1 (apparent molecular weight of 64, 55, and 45 kDa respectively, Figure 2A), we then analyzed the c-MYC transcripts in these tumors.

Total RNA was extracted and the 5' and 3' regions were obtained by RACE-PCR. The c-MYC-specific primers that were used are described in Table 1. To obtain the 5'UTR (5'UnTranslated Region), we used the primers P5'UTR1 and P5'UTR2 located at exon 1 and exon 2, respectively (Figure 3A), to account for the different promoter activities (P1, P2, or P3) that were described in the literature. The primer P3'UTR1 (Figure 3A) was used to

obtain 3'UTR. The 5' and 3' established regions allowed us to define PFull1, PFull2, and PFull3 primers (Figure 3B,C) to obtain the total cDNA and the structure of *c-MYC* mRNAs after sequencing. For the 3' region, we repeatedly obtained (Figure S3) the same 3'UTRs for both the lymph nodes and for the BL41 cell line corresponding to the use of the two described polyadenylation sites [18].

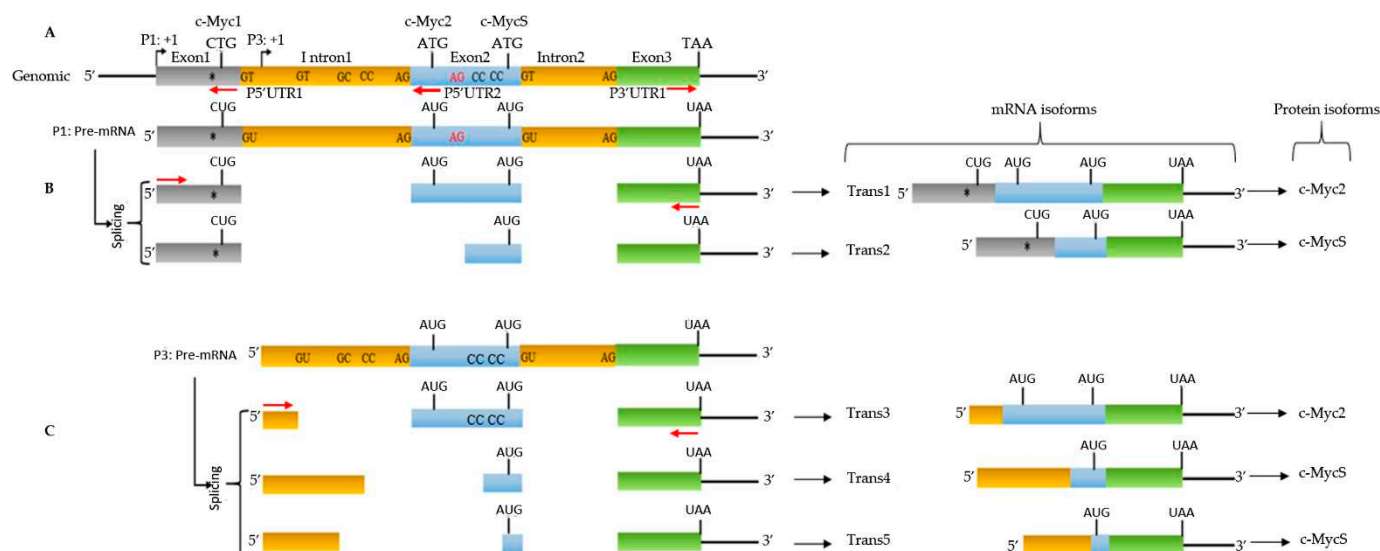


Figure 3. Different events leading to the genesis of several mRNAs of the *c-MYC* gene related to genomic structure. Genomic structure (A) at the origin of the different events (B,C). Primers P5'UTR1 and P5'UTR2 that were used to obtain the 5'UTR; primer P3'UTR1 to obtain the 3'UTR, and the other primers were used as indicated to obtain the full-length cDNA. The dinucleotides indicated represent the different splice donor and acceptor sites. The triplets indicate the translation initiation codons to obtain c-Myc1, c-Myc2, or c-MycS. TAA: Translation stop codon. *: PvuII mutation. Diagram is not to scale.

Sequence analysis of the cDNA revealed the presence of five *c-MYC* transcripts (Figure 3), two from transcription through P1 (P1 promoter) and three from P3 (P3 promoter) which is located at intron 1 (Figure 3A). Transcription from P1 has been reported in the BL60 line, but to our knowledge, the nature of the transcripts has not been described. Transcription from P3 has not been reported in the BL60 cells. It is noteworthy that Trans1 (transcript 1) carries the PvuII mutation which has been suggested to be responsible for the production of the single c-Myc2 variant in BL60 cells (Figures 3 and S4). All *c-MYC* transcripts that were described in this work differ at the 5'UTR and/or at exon 2 (Figure 3). They all have the entire last exon (exon3). In addition, the 5'UTRs of three transcripts (Trans1,2,3) contains termination codons in all three reading frames whereas the two 5'UTR transcripts (Trans4,5) (Figure S5) are in reading frames of a part of exon 2 and the coding region of c-MycS.

3.4. P1 Promoter Transcripts and c-Myc Proteins

The genomic region corresponding to transcripts 1 and 2 (Trans1 and Trans2) resulting from P1 promoter use (Figures 3 and S4) revealed that the mature Trans1 mRNA (Figures 3 and S4) is derived from the canonical splicing of a *c-MYC* pre-mRNA (Figures 3 and S4) that was previously described [15]. However, Trans2 (revealed in this work) is obtained by an alternative splicing acceptor site within exon 2 (Figures 2B and S4). In both cases, the donor (GT) and acceptor (AG) sites are canonical. Translation of the two transcripts in the three reading frames predicts (Figure 3) the formation of c-Myc1 (Trans1) and c-MycS (Trans2) isoforms. Nevertheless, our Western blot experiments (Figure 2A) do not detect the c-Myc1 (p67) isoform. This result is in agreement with previously reported data showing that a substitution near the non-canonical CUG initiation site prevents

translation from the CUG site and thus c-Myc1 production [2]. It is, therefore, very likely that the translation of Trans1 leads to the formation of c-Myc2 from the AUG initiation codon that is located at exon 2 (Figure 3 and Figure S4). Taken together, analysis of the two transcripts coupled with Western blot data (Figure 2A) suggest production of c-Myc2 (instead of c-Myc1) and c-MycS by in vivo translation of Trans1 and Trans2, respectively. The detection of a smaller isoform (45 kDa: c-MycS1) could originate from the translation of Trans1 and/or Trans2 transcripts. Two arguments: the leaky scan of the c-Myc transcript described previously [2], the detection of an isoform of the same size in several human and avian lines and the actual in vitro translation (Figure 2C) support this suggestion. The last open reading frame (Figure S1) of the c-Myc transcript (c-MycS2), although it is translatable (Figure 2C) in vitro (43 kDa), does not seem to translate in vivo. Finally, without excluding hyperphosphorylated isoforms of the c-Myc proteins, we do not have a reasonable explanation to interpret the high molecular weight bands at present.

3.5. P3 Promoter Transcripts and c-Myc Proteins

A similar analysis of the P3 promoter transcripts (Trans3, Trans4 and Trans5) revealed (Figures 3C and S5) that the Trans4 transcript is derived from the splicing of a pre-mRNA with canonical donor and acceptor sites that are located at intron 1 while respecting the canonical sites between exon 2 and exon 3. Since Trans4 lacks exon 1 (Figure 3C), translation of this mRNA in vivo will necessarily lead to the production of c-Myc2. The two other transcripts (Trans3 and Trans4) were derived from alternative splicing of pre-mRNA using different non-canonical splice donor and acceptor sites at intron 1 and exon 2. If these mRNA were translated in vivo, they would produce at least the c-MycS isoform. Overall, P3 transcripts will result in the enrichment of c-Myc2, c-MycS, and for the same reason as suggested above, c-MycS1 isoforms.

3.6. c-MYC Transcripts and c-Myc Proteins in the BL41 Cell Line

Data that were described above led us to carry out a study of c-MYC transcripts and the corresponding proteins in a Burkitt lymphoma cell line.

Total RNA were extracted and subjected to the same RACE-PCR approach to obtain the 5'UTR region and then the total c-MYC mRNA expressed by BL41 cells. We used the same primers as above to obtain the 5' and 3' UTRs. We obtained amplifications with primer P5'UTR2 located in exon 2 (for 5'UTR) and primer P3'UTR1 located in exon 3 (for 3'UTR). We did not obtain any amplification with the other primer P5'UTR1 located in exon 1.

Sequence analysis of cDNA corresponding to the mRNA showed a single repeatedly obtained transcript (Figures 4 and S6). The 5'UTR was formed by a hybrid sequence including an IGH region and the end of intron 1 of c-MYC. The rest of the mRNA was transcribed from exons 2 and 3. This hybrid transcript was probably the result of transcriptional activity at the IGH locus following the *t*(8;14) translocation that characterizes the BL41 cell line. The fact that we did not obtain any amplification with the P5'UTR1 primer supports the presence of only c-MYC transcripts lacking exon 1. The translation of this mRNA predicts c-Myc2 protein in agreement with previously described data and with the results that were obtained by Western blot (Figure 2B).

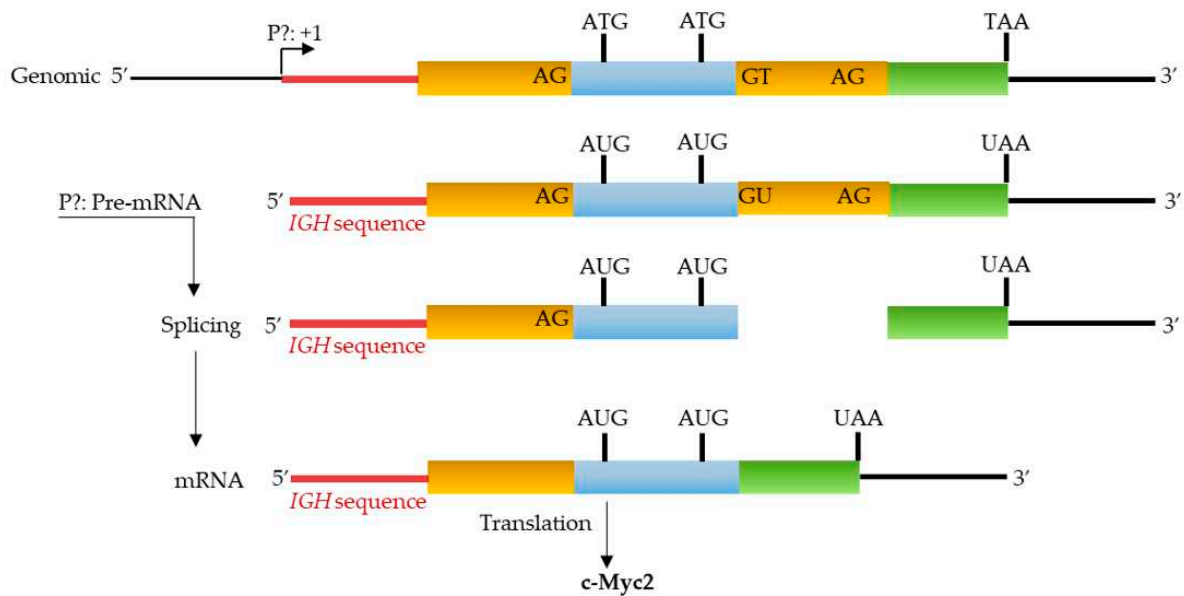


Figure 4. Partial genomic structure of the c-MYC gene that is associated with $t(8;14)$ translocation of BL41. The expression from a yet to be determined promoter (P?) generates a hybrid mRNA with an IGH sequence. The translation of the resulting mRNA leads to the production of the c-Myc2 protein. Diagram is not to scale.

4. Discussion

In this study, we report for the first time that tumor lymph nodes from the $\lambda c-MYC$ (A^{vy}/a) mice exhibit five different c-MYC mRNA that invariably lead to the production of c-Myc2 and/or c-MycS previously described and likely a new isoform c-MycS1 shown on Western blot.

It is now well established that the quantitative and qualitative expression of the two proteins c-Myc1 and c-Myc2 and to a lesser extent c-MycS play an important role in the control of normal (non-cancerous) cell proliferation and cell homeostasis [19]. Although the ratio between these three isoforms is difficult to determine because their quantity changes according to stages of the cell cycle, the mechanisms that support the production of c-Myc2 and/or c-MycS promote a cancerous state: The c-MYC proto-oncogene becomes the c-MYC oncogene [2,19].

Virtually all Burkitt lymphoma cell lines show a rearrangement between the c-MYC locus and one of the immunoglobulin gene loci. These rearrangements alone or in combination with mutations in the 5' region of the c-MYC gene often lead to the production of c-Myc2 alone. Previously, it was shown that the BL60 line carrying the $t(8;22)$ translocation exhibits a shift from promoter 2 to promoter 1 and harbors a substitution that prevents translation from the upstream non-canonical CUG translation site. Thus, BL60 was described to have lost c-Myc1 production and to produce only c-Myc2 [2]. It should be noted that the 12 kbp DNA fragment (Figure 1A) from the $t(8;22)$ translocation of the BL60 line that was used to obtain the $\lambda c-MYC$ mouse [14] contains all the genetic information (including the c-MYC gene) that is necessary for the development of an aggressive B lymphoma, particularly in the lymph nodes. In agreement with these previous data, the Trans1 mRNA that was discovered in this work was derived from the P1 promoter (shift from P2 to P1, as in BL60) and carries the described substitution near the CUG translation site as reported for translation of the only open reading frame of Trans1 which codes for the production c-Myc1. Nevertheless, its presence in Western blots remains undetectable. This observation supports the fact that a mutation near the CUG translation site prevented its use as a translation initiation site and strongly suggests that in vivo translation of Trans1 leads to the formation of c-Myc2.

The second mRNA (Trans2) that we found is also from the P1 promoter, also carries the substitution near CUG, but with alternative splicing at exon 2. The only c-Myc protein that will be produced if this Trans2 is translated in vivo will be c-MycS. This hypothesis is in agreement with our Western blot data.

The other three transcripts (Trans3, 4, and 5) were derived from transcription at the P3 promoter that is located in intron 1. The translation of Trans3 predicts the production of c-Myc2 according to the only open reading frame. However, the predictions that can be drawn from the primary structure of Trans4 and 5 are less clear. Indeed, despite different alternative splicing, Trans4 and 5 each present an open reading frame from, respectively, the first and second nucleotides of transcription initiation to the stop codon at the last exon 3 of the *c-MYC* gene. Several potential non-AUG [20] sites were located in the 5' region of these two mRNA but their use as translation initiation sites remains to be determined experimentally. Finally, we did not identify a specific transcript that could produce the new c-MycS1 isoform suggested in Western blot. Nevertheless, all the transcripts that were described in this work are likely to produce this isoform by the leaky scanning mechanism that has been proposed for the translation of the *c-MYC* transcript [2].

Alternative splicing of pre-mRNA and/or alternative use of promoters play an important role in the genesis and development of different types of cancer. Indeed, many cases of splicing isoforms that lead to or promote cancer progression have been identified. For example, cyclin D1b, the oncogenic form of cyclin D1, expressed in lymphomas, results from alternative splicing. Another example is the anti-apoptotic isoform Bcl-xL which is strongly expressed in a large number of tumors to ensure high cell survival [21]. Finally, the use of alternative promoters and/or alternative splicing generates a complex pattern of pro- and anti-apoptotic isoforms of the TP73 gene [22] which is strikingly similar to the mechanism that is used by the *t(8;22)* translocation as found in this study, to generate only oncogenic forms of c-Myc.

In summary, we report for the first time the concept of multi-transcript genesis as a tool for the development of Burkitt's lymphoma in the case of *t(8;22)* translocation. Our work suggests that this type of approach may be useful for the identification of *c-MYC* transcripts with B lymphoma. Of course, these transcripts will differ depending on the type of B lymphoma that is associated with specific *c-MYC* dysregulation. The BL41 line that was used in this work is an example.

In this context, an exhaustive study of *c-MYC* transcripts in Burkitt lymphoma patients as well as in other animal models becomes necessary. A nanopore sequencing approach is currently underway and the data obtained will provide new diagnostic tools. We posit that this comprehensive characterization of c-Myc transcripts will contribute to reduced expression of oncogenic c-Myc forms in a targeted manner. Indeed, today it is quite possible to target in vivo translation of a specifically characterized transcript using antisense oligonucleotides as therapeutic agents of c-Myc-addicted tumors [23].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12060836/s1>, Figure S1: Alignment of the predicted primary translational structures of the five open reading frames corresponding to c-Myc1, c-Myc2 c-MycS previously described plus two additional potential open reading frames c-MycS1 and cMycS2 suggested by the present work. Note that all these isoforms differ only in the N-terminal part. Figure S2: Full-length open reading frames (Orf) encoding c-Myc1, c-Myc2 or c-MycS, c-MycS1 and c-MycS2 cloned into the pT7CFE1 vector subjected to transcription (T7 promoter) and translation using a mammalian in vitro translation system based on HeLa cell lysates. Figure S3: Nucleotide sequences of the identified 3'UTR types. The translational TAA stop codon is indicated. Alternative AATAAA polyadenylation sites are underlined. Figure S4: Nucleotide sequences of Trans1 and Trans2 transcripts compared to the corresponding genomic structure. Underlined splice donor (GT), acceptor (AG) sites, and initiation codons (CTG, ATG) are indicated. The first amino acids of c-Myc2 and c-MycS are shown. Translation from CTG of Trans1 is prevented by the PvuII mutation. P1:+1: Transcription initiation site from the P1 promoter. PFull1: Primer (Table1); M: The first amino acid, methionine. The rest of c-MYC sequence until the translation stop codon (TAA) is not shown.

Figure S5: Nucleotide sequences of Trans3, Trans4, and Trans5 transcripts compared to the corresponding genomic structure. Underlined dinucleotides represent the splice sites found. The ATG initiation codons for c-Myc2 and c-MycS are indicated. Trans3 translation predicts c-Myc2 protein. Curiously and despite different splicings, Trans4 and Trans5 transcripts do not have a stop codon in their 5'UTR region. Potential non-ATG initiation sites are underlined. P3:+1: transcription initiation site from the P3 promoter. PFull3: Primer; M: The first amino acid, methionine. The rest of c-MYC sequence until the translation stop codon (TAA) is not shown. Figure S6: Nucleotide sequences of the only transcript expressed from a yet to be determined promoter (P?). The transcript exhibits an IGH sequence. This transcript encodes c-Myc2. PFull4: Primer; M: Methionine. The rest of c-MYC sequence until the translation stop codon (TAA) is not shown.

Author Contributions: Conceptualization, A.O.; methodology, D.I. and L.P.; writing—original draft preparation, A.O., D.I. and D.T.; Supervision, J.F.; contributed to proofreading, M.D.-A.; funding acquisition, J.F. and N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the Limousin Region and the Haute Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale contre le Cancer and by the Lyons Club de Corrèze. We do not have a number available.

Institutional Review Board Statement: All animal experiments and protocols were conducted in accordance with the European guidelines and regulations for animals used for scientific purposes, implemented in France as follows “Décret n°2012-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques 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).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank J Cook Moreau, UMR CNRS 7276, Limoges, France, for the English revision.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Thompson, E.B. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 575–600. [[CrossRef](#)]
2. Hann, S.R.; King, M.W.; Bentley, D.L.; Anderson, C.W.; Eisenman, R.N. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* **1988**, *52*, 185–195. [[CrossRef](#)]
3. Spotts, G.D.; Patel, S.V.; Xiao, Q.; Han, S.R. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1459–1468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wierstra, I.; Alves, J. The c-myc promoter: Still MysterY and challenge. *Adv. Cancer Res.* **2008**, *99*, 113–333.
5. Eick, D.; Polack, A.; Kofler, E.; Lenoir, G.M. Expression of P0-and P3-RNA from the normal and translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* **1990**, *5*, 1397–1402.
6. Hann, S.R.; Dixit, M.; Sears, R.C.; Sealy, L. The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2441–2452. [[CrossRef](#)]
7. Benassayag, C.; Montero, L.; Colombie, N.; Gallant, P.; Cribbs, D.; Morello, D. Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 9897–9909. [[CrossRef](#)]
8. Escamilla-Powers, J.R.; Sears, R.C. A conserved pathway that controls c-Myc protein stability through opposing phosphorylation events occurs in yeast. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5432–5442. [[CrossRef](#)]
9. Elżbieta Kasprzyk, M.; Sura, W.; Dzikiewicz-Krawczyk, A. Enhancing B-Cell Malignancies—On Repurposing Enhancer Activity towards Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 3270. [[CrossRef](#)]
10. Roix, J.J.; McQueen, P.G.; Munson, P.J.; Parada, L.A.; Misteli, T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 287–291. [[CrossRef](#)]
11. Gerbitz, A.; Mautner, J.; Geltinger, C.; Hörtnagel, K.; Christoph, B.; Asenbauer, H.; Klobeck, G.; Polack, A.; Bornkamm, G.W. Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8; 22) translocation in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* **1999**, *18*, 1745–1753. [[CrossRef](#)]
12. Dooley, S.; Wundrack, I.; Welter, C.; Blin, N. Constitutive C-myc overexpression and p1/p2 promoter shift in a small-cell lung-cancer cell-line. *Int. J. Oncol.* **1994**, *5*, 65–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ferrad, M.; Ghazzau, N.; Issaoui, H.; Cook-Moreau, J.; Denizot, Y. Mouse models of c-myc deregulation driven by IgH locus enhancers as models of B-cell lymphomagenesis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Kovalchuk, A.L.; Qi, C.F.; Torrey, T.A.; Taddesse-Heath, L.; Feigenbaum, L.; Park, S.S.; Gerbitz, A.; Klobeck, G.; Hoertnagel, K.; Polack, A.; et al. Burkitt lymphoma in the mouse. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1183–1190. [[CrossRef](#)]
15. Cesarman, E.; Dalla-Favera, R.; Bentley, D.; Groudine, M. Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* **1987**, *238*, 1272–1275. [[CrossRef](#)]
16. Bayda, B.; Tilloy, V.; Chaunavel, A.; Bahri, R.; Halabi, M.A.; Feuillard, J.; Jaccard, A.; Ranger-Rogez, S. Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas. *Cancers* **2021**, *13*, 610. [[CrossRef](#)]
17. Wasylshen, A.R.; Chan-Seng-Yue, M.; Bros, C.; Dingar, D.; Tu, W.B.; Kalkat, M.; Chan, P.-K.; Mullen, P.J.; Huang, L.; Meyer, N.; et al. MYC phosphorylation at novel regulatory regions suppresses transforming activity. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 6504–6515. [[CrossRef](#)]
18. Laird-Offringa, I.A.; ElfTerich, P.; Knaken, H.J.; de Ruiter, J.; van der Eb, A.J. Analysis of polyadenylation site usage of the c-myc oncogene. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6499–6514. [[CrossRef](#)]
19. Batsché, E.; Crémisi, C. Opposite transcriptional activity between the wild type c-myc gene coding for c-Myc1 and c-Myc2 proteins and c-Myc1 and c-Myc2 separately. *Oncogene* **1999**, *18*, 5662–5671. [[CrossRef](#)]
20. de Arce, A.J.D.; Noderer, W.L.; Wang, C.L. Complete motif analysis of sequence requirements for translation initiation at non-AUG start codons. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 985–994.
21. Paronetto, M.P.; Passacantilli, I.; Sette, C. Alternative splicing and cell survival: From tissue homeostasis to disease. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1919–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zaika, A.I.; Slade, N.; Erster, S.H.; Sansome, C.; Joseph, T.W.; Pearl, M.; Chalas, E.; Moll, U.M. $\Delta Np73$, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 765–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gill, T.; Wang, H.; Bandaru, R.; Lawlor, M.; Lu, C.; Nieman, L.T.; Tao, J.; Zhang, Y.; Anderson, D.G.; Ting, D.T.; et al. Selective targeting of MYC mRNA by stabilized antisense oligonucleotides. *Oncogene* **2021**, *40*, 6527–6539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Références

Ibrahim, D., Prévaud, L., Faumont, N., Troutaud, D., Feuillard, J., Diab-Assaf, M., & Oulmouden, A. (2022). Alternative c-MYC mRNA Transcripts as an Additional Tool for c-Myc2 and c-MycS Production in BL60 Tumors. *Biomolecules*, *12*(6), 836.

Calado, D. P., Sasaki, Y., Godinho, S. A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B. P., ... & Rajewsky, K. (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nature immunology*, *13*(11), 1092-1100.

Dominguez-Sola, D., Victora, G. D., Ying, C. Y., Phan, R. T., Saito, M., Nussenzweig, M. C., & Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature immunology*, *13*(11), 1083-1091.

Nguyen, L., Papenhausen, P., & Shao, H. (2017). The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects. *Genes*, *8*(4), 116.

Discussion, perspectives

Après la discussion des résultats sur les souris REL-AID (inclue dans le manuscrit du papier soumis), voici une discussion plus générale qui présente quelques perspectives à ce travail.

Le but de mes travaux de thèse était donc d'étudier le rôle de la sous-unité c-Rel NF- κ B dans le contexte du GCB-DLBCL. A mon arrivée en thèse, j'ai donc pu participer à la partie *in-vitro* du projet c-Rel puis sur le reste de mes années, j'ai établi, développé et caractérisé différents modèles de surexpression de la sous-unité c-Rel dans le but de mieux appréhender son rôle et de pouvoir proposer une meilleure compréhension de la lymphomagenèse des GCB-DLBCL.

Comme énoncé dans l'introduction, la dérégulation de NF- κ B constitue une étape importante du développement oncogénique dans les DLBCL. Jusqu'alors, celle-ci avait été étudiée dans son ensemble sans distinguer les rôles propres des sous-unités activatrices RelA, RelB et c-Rel. Grâce à une série de DLBCL bien référencée du LYSA, l'équipe a réalisé par EMSA la caractérisation de l'activation de liaison à l'ADN de RelA, RelB et c-Rel dans les ABC et les GCB-DLBCL. Deux publications ont été produites (*Eluard B et al. 2022*) et (Faumont et al. 2021).

La première (*Eluard B et al. 2022*) indique que RelA est la sous-unité rattachée au sous-type ABC-DLBCL alors que RelB est associée à un mauvais pronostic quel que soit le sous-type. Le chapitre 2 de l'introduction montre l'importance de c-Rel dans le développement et la maturation des cellules B dans le GC, et également les conséquences de sa dérégulation dans certaines pathologies (*Vera et al. 2014, Yoko et al. 2017*). Dans les GCB-DLBCL, des gains de copies de *REL* sont fréquemment retrouvés (*Gilmore and Gerondakis, 2011 ; Gilmore and Courtois 2006 ; Li et al. 2015*) mais le rôle de cette sous-unité restait encore à étudier. Grâce à notre article publié dans « *Frontiers in Oncology* » et présenté dans la première partie des résultats, nous montrons une nouvelle signature transcriptomique associée à c-Rel spécifique du sous-type GCB-DLBCL (Faumont et al. 2021).

Pour les patients exhibant l'amplification de *REL* ainsi que la signature transcriptomique distinctive de c-Rel, le pronostic de survie est plus favorable que l'on regarde l'ensemble des cas ou seulement le sous-type GCB-DLBCL. Bien sûr, ces résultats viennent appuyer ceux déjà connus dans la littérature au sujet du meilleur pronostic de survie des GCB-DLBCL versus les ABC-DLBCL (*Hunter et al. 2020*). **Mais comment expliquer le meilleur pronostic des cas avec dérégulation de c-Rel au sein du sous-type GCB-DLBCL ?** Une explication est apportée dans le papier au travers de l'étude de la complexité génétiques qui est moindre dans les cas associés à c-Rel. On peut spéculer que cette explication n'est pas la seule. Au cours de ma thèse, j'ai investigué l'hypothèse que BACH2, cible transcriptionnelle de c-Rel et régulateur transcriptionnel, pourrait sensibiliser la cellule tumorale à l'apoptose chimio-induite. Bien que ces résultats ne soient pas exposés dans cette thèse (car encore trop préliminaires), j'ai souhaité vous en présenter les grandes lignes.

J'ai donc participé, suivi et encadré des expérimentations (stages M1 et M2) en lien avec cette partie relative à c-Rel et BACH2. Cette recherche a été réalisée à la fois sur des échantillons de patients et des lignées de DLBCL ABC (U2932, OCIIY3 et 10) et GCB (SUDHL4 et SUDHL6). Pour rappel ces lignées ont déjà été évoquées dans le chapitre 4 de mon introduction. **Nous avons observé que les niveaux d'expression des transcrits de BACH2 sont particulièrement élevés chez les patients GCB-DLBCL avec une forte expression de c-Rel.** Ce résultat est obtenu grâce aux données transcriptomiques de la série GHEDI et confirmée par qPCR sur une série de DLBCL du CHU de Limoges (T-test $p < 0.0037$).

Comme mentionné dans l'introduction, BACH2 est connu pour réguler la réaction du GC en association avec BCL6, à noter que BACH2 et BCL6 sont tous les deux des cibles de c-Rel (Swaminathan et al. 2014). BACH2 est capable d'induire l'apoptose lorsque des niveaux de ROS sont anormalement élevés dans les cellules du Lymphome du Manteau et la leucémie myéloïde chronique (Kamio et al, 2003) (Chen et al, 2013). Ce phénomène est lié à la translocation nucléaire de BACH2 suite à la baisse de l'activité de la voie PI3K/AKT (laquelle favorise sa rétention cytoplasmique). La translocation nucléaire de BACH2 induite par des agents thérapeutiques oxydants, modifie la balance BCL6/BACH2 et induit l'apoptose en déréprimant TP53, et réprimant des gènes antioxydants et anti-apoptotiques (Kamio et al, 2003) (Swaminathan et al, 2014). Mais ce constat n'a pas encore été démontré dans le DLBCL. En revanche, une étude de Sakane-Ishikawa et al (Sakane-Ishikawa et al. 2016) démontre qu'une forte expression de BACH2 est corrélée avec une meilleure survie sans rechute (PFS Progression Free Survival) pour 108 cas de patients DLBCL.

Dans les LB du GC, BCL6 et BACH2 sont à l'équilibre, bloquent la différenciation plasmocytaire et protègent les cellules de l'apoptose p53-dépendante (Figure 1).

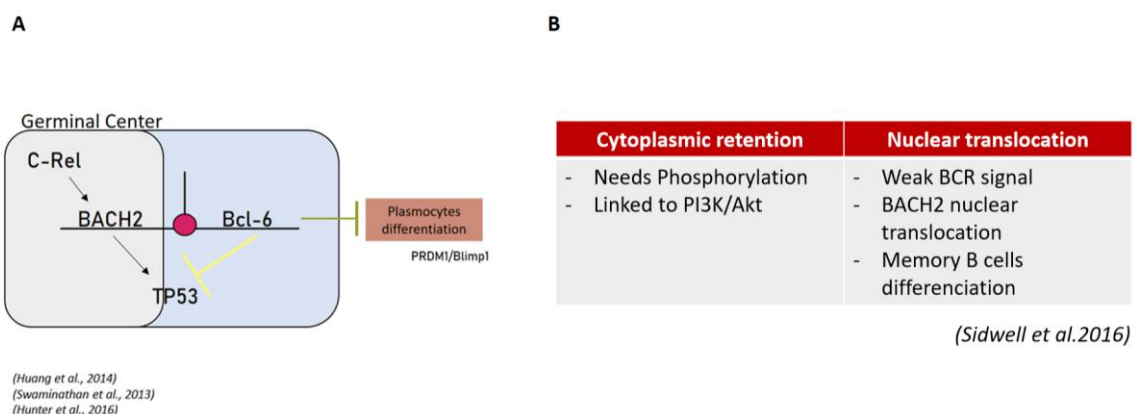


Figure 79. Schéma récapitulatif de la dynamique c-Rel/BACH2 dans le GC

(A) A gauche, la balance BACH2/BCL6 en lien avec leur partenaire c-Rel permet le bon déroulé de la différenciation B terminale. (B) A droite, tableau récapitulatif des fonctions clés

de BACH2 en conditions de rétentions cytoplasmique ou de translocation nucléaire. Les sources sont mentionnées en italique en bas de chaque figure A et B.

D'après Sidwell et al (*Sidwell et al.2016*) la localisation subcellulaire de BACH2 est importante à prendre en compte. En effet BACH2 peut être retenu au cytoplasme par phosphorylation via la voie PI3K/AKT, et sa localisation nucléaire est causée par un signal faible du BCR ce qui initie un engagement vers la différenciation plasmocytaire. Dans ce contexte, notre hypothèse est que dans les GCB-DLBCL (avec forte expression de c-Rel et BACH2), BACH2 est i) essentiellement localisé au cytoplasme (inactif) et ii) transloqué dans le noyau pour induire l'expression de TP53 (i.e. levée du blocage exercé par BCL6) et induire l'apoptose lors d'un stress génotoxique chimio-induit.

Nos résultats sur les lignées SUDHL4 et SUDHL6 indiquent que BACH2 est fortement localisé dans le cytoplasme et que l'ajout de Doxorubicine (dose à l'IC50, déterminée par des tests MTS) s'accompagne de sa translocation nucléaire (vue au microscope confocal). Ces premiers résultats sont en faveur de l'hypothèse posée, nous devons maintenant montrer le lien entre l'induction de l'apoptose et la translocation de BACH2 au noyau. A ces fins, j'ai mis au point des expériences utilisant des siRNA de BACH2 avec plus de 80% d'inhibition. Si ces travaux aboutissent, nous pourrions ainsi faire le lien entre c-Rel, BACH2 et la sensibilité à l'apoptose des GCB-DLBCL avec la signature c-Rel pouvant expliquer leur meilleur pronostic.

Notre modèle REL-YFP/CD19-Cre, comme évoqué dans la partie « Résultats », ne présente pas de phénotype particulier, et ce même au bout de 12 mois de suivi. Ce résultat est surprenant étant donnée l'hyperplasie spontanée de GCB dans le modèle obtenu par transgénèse additionnelle d'un BAC-REL (*Kober-Hasslacher, M et al. 2020*). Ce modèle est décrit dans le Chapitre 4 de l'introduction. L'expression de c-Rel dans ce modèle est aussi pan-B (CD19-Cre), mais elle est supposée forte car dépendante d'un promoteur CAG. Les auteurs montrent que l'effet de c-Rel dans les GCB est dépendant de sa forte expression. Ainsi, l'absence de phénotype dans notre modèle REL-YFP/CD19-Cre pourrait s'expliquer par une trop faible expression de c-Rel via le promoteur du locus Rosa26.

Une insertion du transgène REL-YFP au locus Ig Kappa serait peut-être plus pertinente et pourrait être garante de plus forts niveaux d'expression de notre transgène et donc d'un phénotype. En parallèle des transfections d'ES avec la construction REL-YFP au locus Rosa26, j'ai également réalisé les transfections avec cette fois-ci la construction Ig Kappa. Malgré l'obtention de quelques clones, je n'ai jusqu'alors pas obtenu de clones positifs en vue d'une microinjection après plusieurs tentatives. Nous avons donc concentré nos efforts sur la stratégie Rosa26 même si une construction au locus Ig Kappa reste une piste très intéressante à explorer.

Ce modèle REL-YFP/CD19-Cre, nous a également permis d'étudier fonctionnellement les effets de c-Rel sur les cellules B *ex-vivo* lors de leur différenciation en GCB. Nous mettons ainsi en évidence l'importance du signal médié par le CD40 et BAFF. Les effets de c-Rel sur la prolifération sont faibles alors que ceux sur l'apoptose sont plus marqués en particulier sur les 3 premiers jours de la différenciation GCB. Ce résultat est concordant avec le rôle anti-

apoptotique de c-Rel démontré dans la lignée EREB2.5 (faumont et al. 2021). Nous pourrions donc tester l'effet d'immunisation SRBC sur le modèle REL-YFP/CD19-Cre car le microenvironnement du GC viendra probablement renforcer l'expression de c-Rel et peut être permettre l'apparition d'un phénotype.

Comme précédemment démontré par l'équipe, il existe un contrôle réciproque entre le système immunitaire et la tumeur lors de la transformation liée à NF-κB (Vincent-Fabert et al., 2019). Dans la signature c-Rel des GCB-DLBCL, nous avons trouvé le gène HIP1R qui code un régulateur négatif de PD-L1 (Faumont et al., 2021). Sur une série de 31 tumeurs DLBCL, nous montrons que l'expression de HIP1R est corrélée à celle des transcrits de REL et au sous-type GCB. Ainsi, nous postulons que les tumeurs DLBCL liées à c-Rel sont plus fortement contrôlées par le système immunitaire. Pour étudier l'impact du système immunitaire sur le devenir des cellules B surexprimant c-Rel, nous proposons de traiter les souris REL-YFP/CD19-Cre avec un cocktail anti-T et anti-NK. Ce traitement pourrait favoriser l'apparition d'une lymphoprolifération B.

Alors que le modèle REL-YFP/CD19-Cre suggère que l'effet de c-Rel est dépendant des centres germinatifs, notre modèle REL-AID (REL-YFP/AID-Cre^{ert2}) est venu le confirmer.

Avec ce second modèle, on se rapproche de la situation retrouvée chez l'Homme. C'est-à-dire une altération de c-Rel dans le contexte bien précis de l'environnement du GC avec un challenge immunitaire. La surexpression va donc avoir lieu dans un petit pool de cellules B induites dont on va pouvoir suivre l'évolution au cours du temps. Nous avons donc une fraction de cellules B doublement positive TOM+ et YFP+. Les animaux contrôles (AID-TOM) ont des GCB Tomato+ et YFP-. Comme expliqué dans la section « Résultats », les souris REL-AID auront une population de GCB contrôles Tomato+, YFP- et une population d'intérêt Tomato+, YFP+. L'étude des proportions relatives de ces deux populations (par CMF) montre un avantage de la population double positive dans le compartiment GCB avec commutation isotypique (vers IgG1), indiquant l'effet propre de c-Rel dans le microenvironnement du GC. En adéquation avec notre modèle, notons que les GCB-DLBCL sont fréquemment commutés (ref). Nous avons réalisé un tri des cellules GCB contrôles Tomato+, YFP- et surexprimant c-Rel (Tomato+, YFP+) pour trois souris REL-AID. Les ARN de ces cellules seront analysés par séquençage haut-débit pour identifier les changements d'expression médiés par c-Rel. Nous souhaitons aussi déterminer les gènes cibles directs de c-Rel par CHIPseq.

Ces résultats amènent de forts arguments expérimentaux qui montrent que la surexpression de c-Rel dans les GCB favorise la survie cellulaire sur plusieurs mois pouvant ainsi être prise en compte comme un premier évènement oncogénique de la lymphomagenèse des GCB-DLBCL. Nous présentons ainsi, le premier modèle de surexpression de c-Rel dans les GCB avec une régulation spatiale et temporelle du transgène qui le rend pertinent pour l'étude de la lymphomagenèse des GCB-DLBCL.

Au total, nous avons suivi 16 souris REL-AID et une seule a développé un lymphome B à grandes cellules. La clonalité de cette tumeur doit être vérifiée. Le GCB-DLBCL est une pathologie complexe avec une grande hétérogénéité génétique et moléculaire et un fort déséquilibre génomique (Alizadeh et al. 2000). **Il semble donc impératif d'induire des événements de mutations additionnels dans notre modèle REL-AID pour se rapprocher au plus près de la situation chez l'Homme et voir peut-être une transformation oncogénique.**

Les gains de copies du gène *REL* sont fréquemment retrouvés associés à la translocation de *BCL2* ainsi qu'aux mutations *EZH2*, ou à la perte de *TNFRSF14/HVEM* comme vu dans le chapitre consacré aux mutations des GCB-DLBCL (ref).

Les mutations du gène *TNFRSF14/HVEM* (Herpes virus entry mediator) font partie des altérations qui modifient le microenvironnement tumoral pour favoriser la progression tumorale (Mintz et al., 2019). Ces mutations « perte de fonction » de *TNFRSF14* sont associées à un plus mauvais pronostic dans les Lymphomes Folliculaires (FL) et sont retrouvées dans 56,4 % des FL-transformés (Pasqualucci et al., 2014; Cheung et al., 2010). La perte de *TNFRSF14* est également trouvée dans 66 % des cas EZB des DLBCL (Wright et al., 2020). Cette altération crée un microenvironnement favorable à la tumeur caractérisé par une activation exacerbée du stroma lymphoïde et un recrutement accru des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Boice et al., 2016).

Nous avons établi un modèle de surexpression de c-Rel associé à la perte de *HVEM*. Pour ce faire, nous avons croisé notre modèle murin REL-AID avec un modèle d'inactivation de *TNFRSF14* créé par le laboratoire de M Kronenberg (La Jolla, CA USA) (Seo et al., 2018). Dans ce modèle de souris fl_KO-*TNFRSF14*, les exons 3 et 6 du gène *TNFRSF14* sur le chromosome 17 ont été flanqués de sites loxP pour induire un « knock-out » du gène de manière conditionnelle et spécifique à la cellule B. J'ai pu débuter l'immunophénotypage de ces souris par approche CMF, comme pour les modèles précédents. Le suivi pendant 6 mois des lymphocytes B induits (tamoxifène et SRBC) indique que la perte de *HVEM* augmente l'effet de c-Rel seul dans le compartiment GCB. Cependant, à ce jour nous ne pouvons pas affirmer que ce constat est bien dépendant de c-Rel puisque les souris KO *HVEM* seul n'ont pu être inclus dans la cohorte.

Enfin, un autre modèle est en train d'être établi afin de combiner la surexpression de c-Rel à l'oncogène *BCL2*. Nous utilisons le modèle de souris 3'RR-*BCL2* déjà existant dans notre laboratoire (Zawil et al. 2022). Il s'agit de souris porteuse d'un transgène *BCL2* piloté par la 3'RR (3' regulatory region of IgH) pour imiter l'événement de translocation du gène *BCL2* au locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH). La 3'RR est une mini région de régulation transcriptionnelle du locus IgH. Le « superenhancer » 3'RR d'IgH permet une dérégulation de *BCL2* centrée sur les B du CG.

Une autre piste d'investigation serait de pouvoir soumettre les cellules issues de nos modèles à de la dérivation d'ES où nous pourrions alors induire le nombre de mutations souhaitées additionnelles par le biais de la technique CRISPR/Cas9. Des premières expériences de dérivation d'ES à partir des souris REL-AID ont d'ailleurs été menées au cours de mon doctorat et la caractérisation de ces cellules ES reste à faire.

Références

- Chu, V. T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., ... & Kühn, R. (2016). Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC biotechnology*, *16*(1), 1-15.
- Kober-Hasslacher, M., Oh-Strauß, H., Kumar, D., Soberon, V., Diehl, C., Lech, M., ... & Schmidt-Supprian, M. (2020). c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(6), 3270-3286.
- Ennishi, D. (2021). The biology of the tumor microenvironment in DLBCL: Targeting the “don't eat me” signal. *Journal of clinical and experimental hematopathology*, *61*(4), 210-215.
- David, A., Arnaud, N., Fradet, M., Lascaux, H., Ouk-Martin, C., Gachard, N., ... & Faumont, N. (2017). c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- κ B activated B cells. *Haematologica*, *102*(5), 883.
- Zawil, L., Marchiol, T., Brauge, B., Saintamand, A., Carrion, C., Dessauge, E., ... & Cogné, M. (2022). Distinct B-Cell Specific Transcriptional Contexts of the BCL2 Oncogene Impact Pre-Malignant Development in Mouse Models. *Cancers*, *14*(21), 5337.
- Deaglio, S. (2023). Chemoresistance pathways in DLBCL. *Blood*, *142*(11), 943-944.
- Saliba, J., Manseur, C., Groult, H., Akil, H., Tannoury, M., Troutaud, D., ... & Jayat-Vignoles, C. (2023). Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic vLMW Fucoidan Formulas Decrease PD-L1 Surface Expression in EBV Latency III and DLBCL Tumoral B-Cells by Decreasing Actin Network. *Marine drugs*, *21*(2), 132.

Conclusion

La complexité, l'hétérogénéité ainsi que le manque d'options thérapeutiques pour la prise en charge des patients DLBCL soulignent l'importance de l'effort de recherche à fournir afin de mieux comprendre ces pathologies. Au travers des approches à la fois *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, j'ai pu mieux appréhender le rôle de la sous-unité c-Rel NF- κ B dans le GCB-DLBCL.

L'objectif de ma thèse est donc rempli grâce à l'établissement de nos deux modèles murins surexprimant c-Rel dans tous les B CD19+ ainsi que dans les B du GC. Nous avons pu voir l'importance de l'environnement spécifique du GC concernant l'immunophénotype de nos souris. c-Rel confère un avantage de survie en reprogrammant les cellules B du GC. Ces nouveaux modèles, nous permettrons donc de comprendre la coopération de c-Rel avec ses partenaires oncogéniques tels que BCL2 et HVEM.

L'ensemble de ces travaux a donc permis de mieux cerner le rôle de c-Rel NF- κ B dans les GCB-DLBCL et surtout d'ouvrir un large champ de recherche et de questions scientifiques à la suite de ces premiers résultats. A terme, et guidés par nos résultats, nous aurons alors des modèles précliniques de choix surexprimant c-Rel pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques.

Références

Abbas et Lichtman. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 2009

Abramson, J. S. (2019). Hitting back at lymphoma: How do modern diagnostics identify high-risk diffuse large B-cell lymphoma subsets and alter treatment?. *Cancer*, *125*(18), 3111-3120.

Adler, L. N., Jiang, W., Bhamidipati, K., Millican, M., Macaubas, C., Hung, S. C., & Mellins, E. D. (2017). The other function: class II-restricted antigen presentation by B cells. *Frontiers in immunology*, *8*, 319.

Aggarwal, P., & Limaiem, F. (2019). Reed Sternberg Cells.

Ahmadi, A., Fallah Vastani, Z., Abounoori, M., Azizi, M., Labani-Motlagh, A., Mami, S., & Mami, S. (2022). The role of NK and NKT cells in the pathogenesis and improvement of multiple sclerosis following disease-modifying therapies. *Health Science Reports*, *5*(1), e489.

Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *20*(4), 229-238.

Alcamo, E., Mizgerd, J. P., Horwitz, B. H., Bronson, R., Beg, A. A., Scott, M., ... & Baltimore, D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF- κ B in leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology*, *167*(3), 1592-1600.

Alinikula, J., Nera, K. P., Junttila, S., & Lassila, O. (2011). Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *European journal of immunology*, *41*(8), 2404-2413.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., ... & Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, *403*(6769), 503-511.

Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Jung, S., Avraham, A., Gerlitz, O., ... & Ben-Neriah, Y. (1995). In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(3), 1294-1301.

Allen, C. D., & Cyster, J. G. (2008, February). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 1, pp. 14-25). Academic Press.

Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., & Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology*, *5*(9), 943-952.

Allman, D., Li, J., & Hardy, R. R. (1999). Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *The Journal of experimental medicine*, *189*(4), 735-740.

Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A., & Hardy, R. R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *The Journal of Immunology*, *167*(12), 6834-6840.

Almeida, J. S., Casanova, J. M., Santos-Rosa, M., Tarazona, R., Solana, R., & Rodrigues-Santos, P. (2023). Natural Killer T-like Cells: Immunobiology and Role in Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2743.

- Al-Naeeb, A. B., Ajithkumar, T., Behan, S., & Hodson, D. J. (2018). Non-Hodgkin lymphoma. *Bmj*, 362.
- Amanna, Ian J., Nichole E. Carlson, and Mark K. Slifka. "Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens." *New England Journal of Medicine* 357.19 (2007): 1903-1915.
- Anbazhagan, K., Rabbind Singh, A., Isabelle, P., Stella, I., Céline, A. D. M., Bissac, E., ... & Lassoued, K. (2013). Human pre-B cell receptor signal transduction: evidence for distinct roles of PI 3 kinase and MAP-kinase signalling pathways. *Immunity, inflammation and disease*, 1(1), 26-36.
- Anderson, L. A., Gadalla, S., Morton, L. M., Landgren, O., Pfeiffer, R., Warren, J. L., ... & Engels, E. A. (2009). Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *International journal of cancer*, 125(2), 398-405.
- Andor, N., Maley, C. C., & Ji, H. P. (2017). Genomic instability in cancer: teetering on the limit of tolerance. *Cancer research*, 77(9), 2179-2185.
- Andrique, L., Poglio, S., Prochazkova-Carlotti, M., Kadin, M. E., Giese, A., Idrissi, Y., ... & Chevret, E. (2016). Intrahepatic xenograft of cutaneous T-cell lymphoma cell lines: a useful model for rapid biological and therapeutic evaluation. *The American Journal of Pathology*, 186(7), 1775-1785.
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., & Baldwin, A. S. (2003). A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependent gene expression. *Nature*, 423(6940), 659-663.
- Aribi, M. (2020). Immunogenetic aspect of B-cell antigen receptor diversity generation. *Normal and Malignant B-Cell*, 23.
- Armitage, J. O., & Longo, D. L. (2022). Mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 386(26), 2495-2506.
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-hodgkin lymphoma. *The lancet*, 390(10091), 298-310.
- Attaf, N., Baaklini, S., Binet, L., & Milpied, P. (2021). Heterogeneity of germinal center B cells: New insights from single-cell studies. *European Journal of Immunology*, 51(11), 2555-2567.
- Bakhshi, T. J., & Georgel, P. T. (2020). Genetic and epigenetic determinants of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 10(12), 123.
- Baldwin Jr, A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14(1), 649-681.
- Baltimore, D. (2009). Discovering NF- κ B. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), a000026.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., ... & Dörken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *The Journal of clinical investigation*, 100(12), 2961-2969.
- Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., ... & Dörken, B. (1996). High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells.
- Barrans, S. L., Evans, P. A., O'Connor, S. J., Kendall, S. J., Owen, R. G., Haynes, A. P., ... & Jack, A. S. (2003). The t (14; 18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clinical cancer research*, 9(6), 2133-2139.

- Barth, T. F., Martin-Subero, J. I., Joos, S., Menz, C. K., Hasel, C., Mechttersheimer, G., ... & Möller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(9), 3681-3686.
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological reviews*, 247(1), 172-183.
- Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A. A., Wang, K., Lim, W. K., ... & Dalla-Favera, R. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(5), 975-984.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 11(1), 34-46.
- Baumjohann, D., Okada, T., & Ansel, K. M. (2011). Cutting edge: distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2089-2092.
- Bea, S., Zettl, A., Wright, G., Salaverria, I., Jehn, P., Moreno, V., ... & Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*, 106(9), 3183-3190.
- Beg, A. A., & Baldwin Jr, A. S. (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development*, 7(11), 2064-2070.
- Beg, A. A., & Baltimore, D. (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, 274(5288), 782-784.
- Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K. L., Rosen, M., ... & Melnick, A. M. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer cell*, 23(5), 677-692.
- Béguelin, W., Teater, M., Gearhart, M. D., Fernández, M. T. C., Goldstein, R. L., Cárdenas, M. G., ... & Melnick, A. M. (2016). EZH2 and BCL6 cooperate to assemble CBX8-BCOR complex to repress bivalent promoters, mediate germinal center formation and lymphomagenesis. *Cancer cell*, 30(2), 197-213.
- Behring, E. & Kitasato, S. *Deutsch. med. Wochenschr.* **16**, 1113–1114 (1890); Behring, E. & Wernicke, E. *Z. Hyg.* **12**, 10–44; 45–57 (1892).
- Belguise, K., & Sonenshein, G. E. (2007). PKC θ promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor α synthesis. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), 4009-4021.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., & Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annual review of immunology*, 15(1), 535-562.
- Bendelac, A., Savage, P. B., & Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 297-336.
- Benveniste, P. M., Roy, S., Nakatsugawa, M., Chen, E. L., Nguyen, L., Millar, D. G., ... & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2018). Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human $\gamma\delta$ T cells. *Science immunology*, 3(30), eaav4036.

- Benveniste, P. M., Roy, S., Nakatsugawa, M., Chen, E. L., Nguyen, L., Millar, D. G., ... & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2018). Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human $\gamma\delta$ T cells. *Science immunology*, 3(30), eaav4036.
- Bettelli, E., Dastrange, M., & Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5138-5143.
- Boehm, T. (2008). Thymus development and function. *Current opinion in immunology*, 20(2), 178-184.
- Boehmer, H. V. (1988). The developmental biology of T lymphocytes. *Annual review of immunology*, 6(1), 309-326.
- Boice, M., Salloum, D., Mourcin, F., Sanghvi, V., Amin, R., Oricchio, E., ... & Wendel, H. G. (2016). Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell*, 167(2), 405-418.
- Bonasia, C. G., Abdulahad, W. H., Rutgers, A., Heeringa, P., & Bos, N. A. (2021). B cell activation and escape of tolerance checkpoints: recent insights from studying autoreactive B cells. *Cells*, 10(5), 1190.
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), 280-288.
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), S460-S475.
- Bortnick, A., He, Z., Aubrey, M., Chandra, V., Denholtz, M., Chen, K., ... & Murre, C. (2020). Plasma cell fate is orchestrated by elaborate changes in genome compartmentalization and inter-chromosomal hubs. *Cell reports*, 31(1).
- Bottero, V., Withoff, S., & Verma, I. M. (2006). NF- κ B and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 785-797.
- Brescia, P., Schneider, C., Holmes, A. B., Shen, Q., Hussein, S., Pasqualucci, L., ... & Dalla-Favera, R. (2018). MEF2B instructs germinal center development and acts as an oncogene in B cell lymphomagenesis. *Cancer cell*, 34(3), 453-465.
- Briney, B. S., Willis, J. R., & Crowe Jr, J. E. (2012). Human peripheral blood antibodies with long HCDR3s are established primarily at original recombination using a limited subset of germline genes. *PloS one*, 7(5), e36750.
- Brockman, J. A., Scherer, D. C., McKinsey, T. A., Hall, S. M., Qi, X., Lee, W. Y., & Ballard, D. W. (1995). Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Molecular and cellular biology*, 15(5), 2809-2818.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., ... & Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*, 7(1), 12150.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., & Siebenlist, U. (1995). Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*, 267(5203), 1485-1488.
- Brownell, E., O'Brien, S. J., Nash, W. G., & Rice, N. (1985). Genetic characterization of human c-rel sequences. *Molecular and cellular biology*, 5(10), 2826-2831.

- Bujisic, B., De Gassart, A., Tallant, R., Demaria, O., Zaffalon, L., Chelbi, S., ... & Martinon, F. (2017). Impairment of both IRE1 expression and XBP1 activation is a hallmark of GCB DLBCL and contributes to tumor growth. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(17), 2420-2428.
- Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol* (2015) 6:394. doi:10.3389/fimmu.2015.00394
- Bunting, K., Rao, S., Hardy, K., Woltring, D., Denyer, G. S., Wang, J., ... & Shannon, M. F. (2007). Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF- κ B transcription factor c-Rel. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7097-7109.
- BURNET, S. F. M. (1949). *The Production of Antibodies. By FM Burnet... and Frank Fenner...* Macmillan & Company.
- Burrows, N., Bashford-Rogers, R. J., Bhute, V. J., Penalver, A., Ferdinand, J. R., Stewart, B. J., ... & Maxwell, P. H. (2020). Dynamic regulation of hypoxia-inducible factor-1 α activity is essential for normal B cell development. *Nature immunology*, 21(11), 1408-1420.
- Bystry, R. S., Aluvihare, V., Welch, K. A., Kallikourdis, M., & Betz, A. G. (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nature immunology*, 2(12), 1126-1132.
- Caamano, J., Alexander, J., Craig, L., Bravo, R., & Hunter, C. A. (1999). The NF- κ B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 163(8), 4453-4461.
- Caeser, R., Di Re, M., Krupka, J. A., Gao, J., Lara-Chica, M., Dias, J. M., ... & Hodson, D. J. (2019). Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. *Nature Communications*, 10(1), 4543.
- Caganova, M., Carrisi, C., Varano, G., Mainoldi, F., Zanardi, F., Germain, P. L., ... & Casola, S. (2013). Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *The Journal of clinical investigation*, 123(12), 5009-5022.
- Calado, D. P., Sasaki, Y., Godinho, S. A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B. P., ... & Rajewsky, K. (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nature immunology*, 13(11), 1092-1100.
- Calado, D. P., Zhang, B., Srinivasan, L., Sasaki, Y., Seagal, J., Unitt, C., ... & Rajewsky, K. (2010). Constitutive canonical NF- κ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer cell*, 18(6), 580-589.
- Camicia, R., Winkler, H. C., & Hassa, P. O. (2015). Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Molecular cancer*, 14, 1-62.
- Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (Vol. 2, p. 439). S. H. Swerdlow (Ed.). Lyon: International agency for research on cancer.
- Cano, R. L. E., & Lopera, H. D. E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes. In *Autoimmunity: from bench to bedside [Internet]*. El Rosario University Press.
- Cao, Y., Zhu, T., Zhang, P., Xiao, M., Yi, S., Yang, Y., ... & Zhou, J. (2016). Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget*, 7(50), 83294.
- Capece, D., Verzella, D., Flati, I., Arboretto, P., Cornice, J., & Franzoso, G. (2022). NF- κ B: Blending metabolism, immunity, and inflammation. *Trends in Immunology*.

- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., & Pillai, S. (2001). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity*, *14*(5), 603-615.
- Carrasco, D., Weih, F., & Bravo, R. (1994). Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development*, *120*(10), 2991-3004.
- Casulo, C., Burack, W. R., & Friedberg, J. W. (2015). Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *125*(1), 40-47.
- Cattoretti, G., Mandelbaum, J., Lee, N., Chaves, A. H., Mahler, A. M., Chadburn, A., ... & MacLennan, A. J. (2009). Targeted Disruption of the S1P2 Sphingosine 1-Phosphate Receptor Gene Leads to Diffuse Large B-Cell Lymphoma Formation S1P2 and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer research*, *69*(22), 8686-8692.
- Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S. V., Shen, Q., ... & Dalla-Favera, R. (2005). Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer cell*, *7*(5), 445-455.
- Cerhan, J. R., & Habermann, T. M. (2021). Epidemiology of marginal zone lymphoma. *Annals of lymphoma*, *5*.
- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S., Said, J. W., & Knowles, D. M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *New England Journal of Medicine*, *332*(18), 1186-1191.
- Challa-Malladi, M., Lieu, Y. K., Califano, O., Holmes, A. B., Bhagat, G., Murty, V. V., ... & Dalla-Favera, R. (2011). Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell*, *20*(6), 728-740.
- Cha-Molstad, H., Young, D. P., Kushner, I., & Samols, D. (2007). The interaction of C-Rel with C/EBP β enhances C/EBP β binding to the C-reactive protein gene promoter. *Molecular immunology*, *44*(11), 2933-2942.
- Chang, H. O. N. G., Messner, H. A., Wang, X. H., Yee, C., Addy, L., Meharchand, J., & Minden, M. D. (1992). A human lymphoma cell line with multiple immunoglobulin rearrangements. *The Journal of clinical investigation*, *89*(3), 1014-1020.
- Chang, Hyun-Dong, Koji Tokoyoda, and Andreas Radbruch. "Immunological memories of the bone marrow." *Immunological reviews* 283.1 (2018): 86-98.
- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R. A., ... & Shipp, M. A. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature medicine*, *24*(5), 679-690.
- Cheah, C. Y., Zucca, E., Rossi, D., & Habermann, T. M. (2022). Marginal zone lymphoma: present status and future perspectives. *haematologica*, *107*(1), 35.
- Chen, C., Edelstein, L. C., & Gélinas, C. (2000). The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-xL. *Molecular and cellular biology*, *20*(8), 2687-2695.
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature reviews Molecular cell biology*, *5*(5), 392-401.
- Chen, Z., Amro, E. M., Becker, F., Hölzer, M., Rasa, S. M. M., Njeru, S. N., ... & Rudolph, K. L. (2019). Cohesin-mediated NF- κ B signaling limits hematopoietic stem cell self-renewal in aging and inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(1), 152-175.

- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., & Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & development*, *9*(13), 1586-1597.
- Cheson, B. D., Nowakowski, G., & Salles, G. (2021). Diffuse large B-cell lymphoma: new targets and novel therapies. *Blood cancer journal*, *11*(4), 68.
- Chu, V. T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., ... & Kühn, R. (2016). Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC biotechnology*, *16*(1), 1-15.
- Chung, J. B., Silverman, M., & Monroe, J. G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology*, *24*(6), 342-348.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology*, *8*(5), 463-470.
- Compagno, M., Lim, W. K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., ... & Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, *459*(7247), 717-721.
- Connors, J. M., Cozen, W., Steidl, C., Carbone, A., Hoppe, R. T., Flechtner, H. H., & Bartlett, N. L. (2020). Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1), 61.
- Cook, G. J., & Pardee, T. S. (2013). Animal models of leukemia: any closer to the real thing?. *Cancer and Metastasis Reviews*, *32*, 63-76.
- Courtois, G. (2002). Les deux sous-unités catalytiques de IKK: plutôt cousines que jumelles. *médecine/sciences*, *18*(12), 1197-1199.
- Courtois, G., & Gilmore, T. D. (2006). Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, *25*(51), 6831-6843.
- Cruse, J., Lewis, R., & Wang, H. (Eds.). (2004). *Immunology guidebook*. Elsevier.
- Curry, C. V., Ewton, A. A., Olsen, R. J., Logan, B. R., Preti, H. A., Liu, Y. C., ... & Chang, C. C. (2009). Prognostic impact of C-REL expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of hematopathology*, *2*, 20-26.
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *62*(10), 698-738.
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., & Staudt, L. M. (2001). Constitutive nuclear factor κ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine*, *194*(12), 1861-1874.
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Rommesser, P. B., ... & Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, *463*(7277), 88-92.
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Rommesser, P. B., ... & Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, *463*(7277), 88-92.
- de Jesús, T. J., & Ramakrishnan, P. (2020). NF- κ B c-Rel dictates the inflammatory threshold by acting as a transcriptional repressor. *Isience*, *23*(3), 100876.
- De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B., & Goriely, S. (2014). Ontogeny of myeloid cells. *Frontiers in immunology*, *5*, 423.

- De Siervi, A., De Luca, P., Moiola, C., Gueron, G., Tongbai, R., Chandramouli, G. V. R., ... & Jong Kil, W. (2009). Identification of new Rel/NFκB regulatory networks by focused genome location analysis. *Cell Cycle*, 8(13), 2093-2100.
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature reviews immunology*, 15(3), 137-148.
- Dejardin, E. (2006). The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical pharmacology*, 72(9), 1161-1179.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., & Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity*, 24(3), 269-281.
- Denk, A., Wirth, T., & Baumann, B. (2000). NF-κB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine & growth factor reviews*, 11(4), 303-320.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. (1995). Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Molecular and cellular biology*, 15(3), 1302-1311.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., & Karin, M. (1996). Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Molecular and cellular biology*, 16(4), 1295-1304.
- Dobrzanski, P., Ryseck, R. P., & Bravo, R. (1994). Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity. *The EMBO journal*, 13(19), 4608-4616.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., ... & Weill, J. C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*, 10(12), 1292-1299.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., ... & Weill, J. C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*, 10(12), 1292-1299.
- Doggett RS, Wood GS, Horning S, et al. The immunologic characterization of 95 nodal and extranodal diffuse large cell lymphomas in 89 patients. *Am J Pathol*. 1984;115(2):245-252.
- Doi, T. S., Takahashi, T., Taguchi, O., Azuma, T., & Obata, Y. (1997). NF-κB RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *The Journal of experimental medicine*, 185(5), 953-962.
- Dominguez, P. M., Ghamlouch, H., Rosikiewicz, W., Kumar, P., Béguelin, W., Fontán, L., ... & Melnick, A. M. (2018). TET2 Deficiency Causes Germinal Center Hyperplasia, Impairs Plasma Cell Differentiation, and Promotes B-cell Lymphomagenesis. *Cancer discovery*, 8(12), 1632-1653.
- Dominguez-Sola, D., Vitoria, G. D., Ying, C. Y., Phan, R. T., Saito, M., Nussenzweig, M. C., & Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature immunology*, 13(11), 1083-1091.
- Donnou, S., Galand, C., Touitou, V., Sautès-Fridman, C., Fabry, Z., & Fisson, S. (2012). Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. *Advances in hematology*, 2012.

- Donocoff, R. S., Teteloshvili, N., Chung, H., Shoulson, R., & Creusot, R. J. (2020). Optimization of tamoxifen-induced Cre activity and its effect on immune cell populations. *Scientific Reports*, *10*(1), 15244.
- Donovan, C. E., Mark, D. A., He, H. Z., Liou, H. C., Kobzik, L., Wang, Y., ... & Finn, P. W. (1999). NF- κ B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *The Journal of Immunology*, *163*(12), 6827-6833.
- Duan, S., Cermak, L., Pagan, J. K., Rossi, M., Martinengo, C., Di Celle, P. F., ... & Pagano, M. (2012). FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature*, *481*(7379), 90-93.
- Dyer, M. J., Fischer, P., Nacheva, E., Labastide, W., & Karpas, A. (1990). A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t (14; 18) and t (4; 11) chromosomal translocations.
- Edwards, J. C., & Cambridge, G. (2006). B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*, *6*(5), 394-403.
- Egle, A., Harris, A. W., Bath, M. L., O'Reilly, L., & Cory, S. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood*, *103*(6), 2276-2283.
- Ehrlich, P. *Deutsch. med. Wochenschr.* **17**, 976–979; 1218–1219 (1891).
- Eley, B. S., & Beatty, D. W. (2009). The basic immunology of tuberculosis. In *Tuberculosis* (pp. 75-86). WB Saunders.
- Elsner, R. A., & Shlomchik, M. J. (2020). Germinal center and extrafollicular B cell responses in vaccination, immunity, and autoimmunity. *Immunity*, *53*(6), 1136-1150.
- Eluard, B., Nuan-Aliman, S., Faumont, N., Collares, D., Bordereaux, D., Montagne, A., ... & Baud, V. (2022). The alternative RelB NF- κ B subunit is a novel critical player in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *139*(3), 384-398.
- Enciso-Mora, V., Broderick, P., Ma, Y., Jarrett, R. F., Hjalgrim, H., Hemminki, K., ... & Lightfoot, T. (2010). A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16. 1 (REL), 8q24. 21 and 10p14 (GATA3). *Nature genetics*, *42*(12), 1126-1130.
- Ennishi, D., Takata, K., Béguelin, W., Duns, G., Mottok, A., Farinha, P., ... & Steidl, C. (2019). Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition. *Cancer discovery*, *9*(4), 546-563.
- Epstein, A. L., & Kaplan, H. S. (1978). Biology of the human malignant lymphomas. *Lymphoid Neoplasias I: Classification Categorization Natural History*, 190-200.
- Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., & Åkerman, M. (2008). Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International journal of cancer*, *123*(7), 1657-1663.
- Espín-Palazón, R., & Traver, D. (2016). The NF- κ B family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Experimental hematology*, *44*(7), 519-527
- Fan, G., Fan, Y., Gupta, N., Matsuura, I., Liu, F., Zhou, X. Z., ... & Gélinas, C. (2009). Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 markedly enhances the oncogenic activity of the Rel proteins in the nuclear factor- κ B family. *Cancer research*, *69*(11), 4589-4597.

- Fangazio, M., Ladewig, E., Gomez, K., Garcia-Ibanez, L., Kumar, R., Teruya-Feldstein, J., ... & Dalla-Favera, R. (2021). Genetic mechanisms of HLA-I loss and immune escape in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(22), e2104504118.
- Faumont, N., Taoui, O., Collares, D., Jais, J. P., Leroy, K., Prévaud, L., ... & Feuillard, J. (2021). c-Rel Is the Pivotal NF- κ B Subunit in Germinal Center Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A LYSA Study. *Frontiers in Oncology*, *11*, 638897.
- Fehervari, Z. (2013). Thymic B cells. *Nature Immunology*, *14*(12), 1211-1211.
- Felce, S. L., Anderson, A. P., Maguire, S., Gascoyne, D. M., Armstrong, R. N., Wong, K. K., ... & Banham, A. H. (2020). CRISPR/Cas9-mediated Foxp1 silencing restores immune surveillance in an immunocompetent A20 lymphoma model. *Frontiers in oncology*, *10*, 448.
- Feller, A. C., & Diebold, J. (2003). *Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphomas*. Springer Science & Business Media.
- Feng, B., Cheng, S., Pear, W. S., & Liou, H. C. (2004). NF- κ B inhibitor blocks B cell development at two checkpoints. *Medical immunology*, *3*(1), 1-16.
- Ferreiro, D. U., & Komives, E. A. (2010). Molecular mechanisms of system control of NF- κ B signaling by I κ B α . *Biochemistry*, *49*(8), 1560-1567.
- Flori, M., Schmid, C. A., Sumrall, E. T., Tzankov, A., Law, C. W., Robinson, M. D., & Müller, A. (2016). The hematopoietic oncoprotein FOXP1 promotes tumor cell survival in diffuse large B-cell lymphoma by repressing S1PR2 signaling. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(11), 1438-1448.
- Flümann, R., Rehkämper, T., Nieper, P., Pfeiffer, P., Holzem, A., Klein, S., ... & Knittel, G. (2021). An Autochthonous Mouse Model of Myd88-and BCL2-Driven Diffuse Large B-cell Lymphoma Reveals Actionable Molecular Vulnerabilities. *Blood cancer discovery*, *2*(1), 70-91.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*, *4*(4), 330-336.
- Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2017). The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity*, *47*(5), 820-833.
- Frick, M., Dörken, B., & Lenz, G. (2011). The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma. *Therapeutic advances in hematology*, *2*(6), 369-379.
- Friedrich, G., & Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & development*, *5*(9), 1513-1523.
- Fujiwara, S., Imadome, K. I., & Takei, M. (2015). Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Experimental & molecular medicine*, *47*(1), e135-e135.
- Fullard, N., Wilson, C. L., & Oakley, F. (2012). Roles of c-Rel signalling in inflammation and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *44*(6), 851-860.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., & Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes & development*, *18*(4), 411-422.
- Gabrilovich, D. I., Bronte, V., Chen, S. H., Colombo, M. P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., & Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, *67*(1), 425-425.

- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 253-268.
- García-Ramírez, I., Tadros, S., González-Herrero, I., Martín-Lorenzo, A., Rodríguez-Hernández, G., Moore, D., ... & Green, M. R. (2017). Crebbp loss cooperates with Bcl2 overexpression to promote lymphoma in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(19), 2645-2656.
- Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F., & Brink, R. (2008). TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity*, 28(3), 391-401.
- Gaspar-Pereira, S., Fullard, N., Townsend, P. A., Banks, P. S., Ellis, E. L., Fox, C., ... & Caamaño, J. H. (2012). The NF- κ B subunit c-Rel stimulates cardiac hypertrophy and fibrosis. *The American journal of pathology*, 180(3), 929-939.
- Gatto, D., & Brink, R. (2010). The germinal center reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 898-907.
- Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 18(8), 485-497.
- George, S. T., Lai, J., Ma, J., Stacey, H. D., Miller, M. S., & Mullarkey, C. E. (2021). Neutrophils and influenza: a thin line between helpful and harmful. *Vaccines*, 9(6), 597.
- Gerondakis, S., & Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF- κ B pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000182.
- Gerondakis, S., Banerjee, A., Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Gugasyan, R., Sidwell, T., & Grumont, R. J. (2012). NF- κ B subunit specificity in hemopoiesis. *Immunological reviews*, 246(1), 272-285.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., & Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, 25(51), 6781-6799.
- Gerondakis, S., Strasser, A., Metcalf, D., Grigoriadis, G., Scheerlinck, J. Y., & Grumont, R. J. (1996). Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3405-3409.
- Gieling, R. G., Elsharkawy, A. M., Caamaño, J. H., Cowie, D. E., Wright, M. C., Ebrahimkhani, M. R., ... & Oakley, F. (2010). The c-Rel subunit of nuclear factor- κ B regulates murine liver inflammation, wound-healing, and hepatocyte proliferation. *Hepatology*, 51(3), 922-931.
- Gilmore, T. D., & Gerondakis, S. (2011). The c-Rel transcription factor in development and disease. *Genes & cancer*, 2(7), 695-711.
- Gilmore, T. D., & Morin, P. J. (1993). The I κ B proteins: members of a multifunctional family. *Trends in Genetics*, 9(12), 427-433.
- Gilmore, T. D., Cormier, C., Jean-Jacques, J., & Gapuzan, M. E. (2001). Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene*, 20(48), 7098-7103.

- Gilmore, T. D., Cormier, C., Jean-Jacques, J., & Gapuzan, M. E. (2001). Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene*, *20*(48), 7098-7103.
- Godfrey, D. I., Stankovic, S., & Baxter, A. G. (2010). Raising the NKT cell family. *Nature immunology*, *11*(3), 197-206.
- Good, R. A., & Zak, S. J. (1956). DISTURBANCES IN GAMMA GLOBULIN SYNTHESIS AS "EXPERIMENTS OF NATURE" E. Mead Johnson Award. *Pediatrics*, *18*(1), 109-149.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, *44*(3), 463-475.
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Dąbrowska, K., Wierzbicki, P., Ohams, M., ... & Kłosowska, D. (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Advances in virus research*, *83*, 41-71.
- Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Rheumatol* (2015) *27*(4):388–96
- Gowans, J. L., McGregor, D. D., Cowen, D. M., & Ford, C. E. (1962). Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature*, *196*, 651-655.
- Greenwald, R. J., Tumang, J. R., Sinha, A., Currier, N., Cardiff, R. D., Rothstein, T. L., ... & Denis, G. V. (2004). Eμ-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia. *Blood*, *103*(4), 1475-1484.
- Gregersen, P. K., Amos, C. I., Lee, A. T., Lu, Y., Remmers, E. F., Kastner, D. L., ... & Mikuls, T. R. (2009). REL, encoding a member of the NF-κB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nature genetics*, *41*(7), 820.
- Greiner, V., Puerto, R. B., Liu, S., Herbel, C., Carmona, E. M., & Goldberg, M. S. (2019). CRISPR-mediated editing of the B cell receptor in primary human B cells. *Science*, *369*, 369-378.
- Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Banerjee, A., Grumont, R., Overall, S., Gleeson, P., ... & Gerondakis, S. (2011). c-Rel controls multiple discrete steps in the thymic development of Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *PloS one*, *6*(10).
- Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R. J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C., & Gerondakis, S. (1996). The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *The EMBO journal*, *15*(24), 7099-7107.
- Grossmann, M., Nakamura, Y., Grumont, R., & Gerondakis, S. (1999). New insights into the roles of Rel/NF-κB transcription factors in immune function, hemopoiesis and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *31*(10), 1209-1219.
- Grossmann, M., O'Reilly, L. A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J. M., & Gerondakis, S. (2000). The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *The EMBO journal*, *19*(23), 6351-6360.
- Grumont, R. J., & Gerondakis, S. (1994). The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, *5*(12), 1321-1331.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., & Gerondakis, S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κB1 (NF-κB1)

transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *The Journal of experimental medicine*, 187(5), 663-674.

Grumont, R. J., Rourke, I. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., & Gerondakis, S. (1998). B-lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *The Journal of experimental medicine*, 187(5), 663-674.

Grumont, R. J., Strasser, A., & Gerondakis, S. (2002). B cell growth is controlled by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent induction of Rel/NF- κ B regulated c-myc transcription. *Molecular cell*, 10(6), 1283-1294.

Grumont, R., Lock, P., Mollinari, M., Shannon, F. M., Moore, A., & Gerondakis, S. (2004). The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF- κ B-dependent c-myc expression. *Immunity*, 21(1), 19-30.

Gullickson, P., Xu, Y. W., Niedernhofer, L. J., Thompson, E. L., & Yousefzadeh, M. J. (2022). The role of DNA repair in immunological diversity: from molecular mechanisms to clinical ramifications. *Frontiers in immunology*, 1249.

Gutzeit, C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018). The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European journal of immunology*, 48(7), 1101-1113.

Hacker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE*, 2006(357), re13-re13.

Haller, M. J., Winter, W. E., & Schatz, D. A. (2014). Autoimmune polyglandular syndromes. In *Pediatric endocrinology* (pp. 901-919). WB Saunders.

Hammarlund, E., Thomas, A., Amanna, I. J., Holden, L. A., Slayden, O. D., Park, B., ... & Slifka, M. K. (2017). Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nature communications*, 8(1), 1781.

Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., ... & Chan, W. C. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282.

Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., & Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 173(5), 1213-1225.

Hardy, R. R., Kincade, P. W., & Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity*, 26(6), 703-714.

Hayakawa, Y., & Smyth, M. J. (2006). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1517-1524.

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes & development*, 18(18), 2195-2224.

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362.

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell research*, 21(2), 223-244.

Hayes, S. M., Li, L., & Love, P. E. (2005). TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity*, 22(5), 583-593.

- Healy, J. A., Nugent, A., Rempel, R. E., Moffitt, A. B., Davis, N. S., Jiang, X., ... & Dave, S. S. (2016). GNA13 loss in germinal center B cells leads to impaired apoptosis and promotes lymphoma in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(22), 2723-2731.
- Heipertz, E. L., Zynda, E. R., Stav-Noraas, T. E., Hungler, A. D., Boucher, S. E., Kaur, N., & Vemuri, M. C. (2021). Current perspectives on “off-the-shelf” allogeneic NK and CAR-NK cell therapies. *Frontiers in Immunology*, *12*, 732135.
- Heise, N., De Silva, N. S., Silva, K., Carette, A., Simonetti, G., Pasparakis, M., & Klein, U. (2014). Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- κ B transcription factor subunits. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(10), 2103-2118.
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature protocols*, *2*(8), 1849-1861.
- Hendriks, R. W., & Middendorp, S. (2004). The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends in immunology*, *25*(5), 249-256.
- Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. (2010). Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nature Reviews Cancer*, *10*(7), 470-480.
- Hidalgo, Y., Núñez, S., Fuenzalida, M. J., Flores-Santibáñez, F., Sáez, P. J., Dorner, J., ... & Bono, M. R. (2020). Thymic B cells promote germinal center-like structures and the expansion of follicular helper T cells in lupus-prone mice. *Frontiers in Immunology*, *11*, 696.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., ... & Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor κ B–dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *The Journal of experimental medicine*, *196*(5), 605-617.
- Hofmann AM, Abraham SN. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr Opin Immunol* (2009) *21*(6):679–86. doi:10.1016/j.coi.2009.09.007
- Horcher, M., Souabni, A., & Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity*, *14*(6), 779-790.
- Horn, M., Geisen, C., Cermak, L., Becker, B., Nakamura, S., Klein, C., ... & Antebi, A. (2014). DRE-1/FBXO11-dependent degradation of BLMP-1/BLIMP-1 governs *C. elegans* developmental timing and maturation. *Developmental cell*, *28*(6), 697-710.
- Horton, S. J., Giotopoulos, G., Yun, H., Vohra, S., Sheppard, O., Bashford-Rogers, R., ... & Huntly, B. J. (2017). Early loss of Crebbp confers malignant stem cell properties on lymphoid progenitors. *Nature cell biology*, *19*(9), 1093-1104.
- Houldsworth, J., Olshen, A. B., Cattoretti, G., Donnelly, G. B., Teruya-Feldstein, J., Qin, J., ... & Chaganti, R. S. K. (2004). Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, *103*(5), 1862-1868.
- Hsu, L. Y., Liang, H. E., Johnson, K., Kang, C., & Schlissel, M. S. (2004). Pax5 activates immunoglobulin heavy chain V to DJ rearrangement in transgenic thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, *199*(6), 825-830.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., ... & Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science*, *284*(5412), 316-320.

- Huang, C., Geng, H., Boss, I., Wang, L., & Melnick, A. (2014). Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(7), 1012-1020.
- Huang, C., Gonzalez, D. G., Cote, C. M., Jiang, Y., Hatzi, K., Teater, M., ... & Melnick, A. (2014). The BCL6 RD2 domain governs commitment of activated B cells to form germinal centers. *Cell reports*, 8(5), 1497-1508.
- Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., & Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1014-1019.
- Huang, W. C., & Hung, M. C. (2013). Beyond NF- κ B activation: nuclear functions of I κ B kinase α . *Journal of biomedical science*, 20, 1-13.
- Hunter, E., McCord, R., Ramadass, A. S., Green, J., Westra, J. W., Mundt, K., & Akoulitchev, A. (2020). Comparative molecular cell-of-origin classification of diffuse large B-cell lymphoma based on liquid and tissue biopsies. *Translational Medicine Communications*, 5(1), 1-13.
- Hunter, J. E., Butterworth, J. A., Zhao, B., Sellier, H., Campbell, K. J., Thomas, H. D., ... & Perkins, N. D. (2016). The NF- κ B subunit c-Rel regulates Bach2 tumour suppressor expression in B-cell lymphoma. *Oncogene*, 35(26), 3476-3484.
- Hunter, J. E., Leslie, J., & Perkins, N. D. (2016). c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. *British journal of cancer*, 114(1), 1-6.
- Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A., & Muto, A. (2014). Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunological reviews*, 261(1), 116-125.
- Iqbal, J., Greiner, T. C., Patel, K., Dave, B. J., Smith, L., Ji, J., ... & Chan, W. C. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21(11), 2332-2343.
- Iqbal, J., Sanger, W. G., Horsman, D. E., Rosenwald, A., Pickering, D. L., Dave, B., ... & Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project. (2004). BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of pathology*, 165(1), 159-166.
- Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R. J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., ... & McNally, A. (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3001-3014.
- Jacobsen, E. (2022). Follicular lymphoma: 2023 update on diagnosis and management. *American Journal of Hematology*, 97(12), 1638-1651.
- Jameson, S. C., Hogquist, K. A., & Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology*, 13(1), 93-126.
- Jameson, S. C., Hogquist, K. A., & Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology*, 13(1), 93-126.
- Janosy G, Bollum FJ, Bradstock KF, Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood*. 1980;56(3):430-441
- Jia, Z., He, J., Cen, L., Han, W., Jiang, N., Yang, J., & Zhou, M. (2012). P53 deletion is independently associated with increased age and decreased survival in a cohort of Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 53(11), 2182-2185.

- Jiang, Y., Ortega-Molina, A., Geng, H., Ying, H. Y., Hatzi, K., Parsa, S., ... & Melnick, A. M. (2017). CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer discovery*, 7(1), 38-53.
- Jost, P. J., & Ruland, J. (2007). Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 109(7), 2700-2707.
- Jost, P. J., & Ruland, J. (2007). Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 109(7), 2700-2707.
- Kaileh, M., & Sen, R. (2012). NF- κ B function in B lymphocytes. *Immunological reviews*, 246(1), 254-271.
- Kaku, H., Horikawa, K., Obata, Y., Kato, I., Okamoto, H., Sakaguchi, N., ... & Takatsu, K. (2002). NF- κ B is required for CD38-mediated induction of C γ 1 germline transcripts in murine B lymphocytes. *International immunology*, 14(9), 1055-1064.
- Kalaitzidis, D., Davis, R. E., Rosenwald, A., Staudt, L. M., & Gilmore, T. D. (2002). The human B-cell lymphoma cell line RC-K8 has multiple genetic alterations that dysregulate the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene*, 21(57), 8759-8768.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., ... & Nutt, S. L. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*, 26(5), 555-566.
- Kappler, J. W., Roehm, N., & Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49(2), 273-280.
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews immunology*, 5(10), 749-759.
- Karube, K., Enjuanes, A., Dlouhy, I., Jares, P., Martin-Garcia, D., Nadeu, F., ... & Campo, E. (2018). Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*, 32(3), 675-684.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., ... & Ogawa, S. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459(7247), 712-716.
- Schmitz, R., Hansmann, M. L., Bohle, V., Martin-Subero, J. I., Hartmann, S., Mechtersheimer, G., ... & Küppers, R. (2009). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 981-989.
- Keino, H., Watanabe, T., Sato, Y., Niikura, M., Wada, Y., & Okada, A. A. (2008). Therapeutic effect of the potent IL-12/IL-23 inhibitor STA-5326 on experimental autoimmune uveoretinitis. *Arthritis research & therapy*, 10(5), R122.
- Kennedy, R., & Klein, U. (2018). Aberrant activation of NF- κ B signalling in aggressive lymphoid malignancies. *Cells*, 7(11), 189.
- Kenneth, N. S., Mudie, S., & Rocha, S. (2010). IKK and NF- κ B-mediated regulation of Claspin impacts on ATR checkpoint function. *The EMBO journal*, 29(17), 2966-2978.
- Kerfoot, S. M., Yaari, G., Patel, J. R., Johnson, K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein, S. H., & Haberman, A. M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*, 34(6), 947-960.
- Kienzler, A. K., & Eibel, H. (2016). Human B cell development and tolerance.

- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., & Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, *34*(6), 961-972.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., & Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, *34*(6), 961-972.
- Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology*, *8*(1), 22-33.
- Klein, U., & Heise, N. (2015). Unexpected functions of NFκB during germinal center B-cell development: implications for lymphomagenesis. *Current opinion in hematology*, *22*(4), 379.
- Klein, U., & Heise, N. (2015). Unexpected functions of NFκB during germinal center B-cell development: implications for lymphomagenesis. *Current opinion in hematology*, *22*(4), 379.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad Jr, J., Miljkovic, V., ... & Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2639-2644.
- Knittel, G., Liedgens, P., Korovkina, D., Seeger, J. M., Al-Baldawi, Y., Al-Maarri, M., ... & Reinhardt, H. C. (2016). B-cell-specific conditional expression of Myd88 p. L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(22), 2732-2741.
- Kober-Hasslachner, M., Oh-Strauß, H., Kumar, D., Soberon, V., Diehl, C., Lech, M., ... & Schmidt-Supprian, M. (2020). c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(6), 3270-3286.
- Kohnken, R., Porcu, P., & Mishra, A. (2017). Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research. *Frontiers in oncology*, *7*, 22.
- Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., Prohaska, S. S., Scherer, D. C., Beilhack, G. F., ... & Weissman, I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*, *21*(1), 759-806.
- Köntgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., & Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes & development*, *9*(16), 1965-1977.
- Kourilsky, P., & Claverie, J. M. (1988). Le modèle du soi peptidique
- Kralova, J. A. R. M. I. L. A., Schatzle, J. D., Bargmann, W., & Bose Jr, H. R. (1994). Transformation of avian fibroblasts overexpressing the c-rel proto-oncogene and a variant of c-rel lacking 40 C-terminal amino acids. *Journal of virology*, *68*(4), 2073-2083.
- Krejsgaard, T., Kopp, K., Ralfkiaer, E., Willumsgaard, A. E., Eriksen, K. W., Labuda, T., ... & Woetmann, A. (2010). A novel xenograft model of cutaneous T-cell lymphoma. *Experimental dermatology*, *19*(12), 1096-1102.
- Kridel, R., Sehn, L. H., & Gascoyne, R. D. (2012). Pathogenesis of follicular lymphoma. *The Journal of clinical investigation*, *122*(10), 3424-3431.
- Kronenberg, M., & Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nature Reviews Immunology*, *2*(8), 557-568.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in immunology*, 620.

- Kubacz, M., Kusowska, A., Winiarska, M., & Bobrowicz, M. (2022). In Vitro Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell Line Models as Tools to Investigate Novel Immunotherapeutic Strategies. *Cancers*, 15(1), 235.
- Kumar, V., Shrivastava, S. M., Meghal, T., & Chandra, B. A. (2018). Recent Advances in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Hematology-Latest Research and Clinical Advances*.
- Kusumoto, S., Kobayashi, Y., Sekiguchi, N., Tanimoto, K., Onishi, Y., Yokota, Y., ... & Tobinai, K. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma with extra Bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a "non-germinal center phenotype". *The American journal of surgical pathology*, 29(8), 1067-1073.
- Kyewski, B., & Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571-606.
- Lalic, H., Aurer, I., Batinic, D., Visnjic, D., Smoljo, T., & Babic, A. (2022). Bendamustine: A review of pharmacology, clinical use and immunological effects. *Oncology reports*, 47(6), 1-16.
- La Perle, K. M., & Couto, S. S. (2010). Mouse models of hematolymphoid malignancies. *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*, 203-208.
- Lacy, Stuart E., et al. "Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report." *Blood* 135.20 (2020): 1759-1771.
- Landsverk, Ole JB, et al. "Antibody-secreting plasma cells persist for decades in human intestine." *Journal of Experimental Medicine* 214.2 (2017): 309-317.
- Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018). Transgenic mouse models in cancer research. *Frontiers in oncology*, 8, 268.
- Laskin, D. L., Gardner, C. R., & Laskin, J. D. (2010). Phagocytes. In *Immune System Toxicology* (pp. 133-153). Elsevier Inc..
- Le Gallou, S., Nojima, T., Kitamura, D., Weill, J. C., & Reynaud, C. A. (2017). The AID-Cre-ERT2 model: A tool for monitoring B cell immune responses and generating selective hybridomas. *Germinal Centers: Methods and Protocols*, 243-251.
- LeBien, T. W. (2000). Fates of human B-cell precursors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 96(1), 9-23.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B-lymphocytes: how they develop and function. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(5), 1570-1580.
- Lee, E. K., Joo, E. H., Song, K. A., Choi, B., Kim, M., Kim, S. H., ... & Kang, M. S. (2015). Effects of lymphocyte profile on development of EBV-induced lymphoma subtypes in humanized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42), 13081-13086.
- Lee, S. H., & Hannink, M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of IκBε. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23358-23366.
- Leeman, J. R., Weniger, M. A., Barth, T. F., & Gilmore, T. D. (2008). Deletion analysis and alternative splicing define a transactivation inhibitory domain in human oncoprotein REL. *Oncogene*, 27(53), 6770-6781.
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., Wright, G. W., ... & Staudt, L. M. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, 319(5870), 1676-1679.
- Lenz, G., Wright, G. W., Emre, N. T., Kohlhammer, H., Dave, S. S., Davis, R. E., ... & Staudt, L. M. (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13520-13525.

- Levenson, J. M., Choi, S., Lee, S. Y., Cao, Y. A., Ahn, H. J., Worley, K. C., ... & Sweatt, J. D. (2004). A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *Journal of Neuroscience*, *24*(16), 3933-3943.
- Li, H., Kaminski, M. S., Li, Y., Yildiz, M., Ouillette, P., Jones, S., ... & Malek, S. N. (2014). Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *123*(10), 1487-1498.
- Li, L., Xu-Monette, Z. Y., Ok, C. Y., Tzankov, A., Manyam, G. C., Sun, R., ... & Young, K. H. (2015). Prognostic impact of c-Rel nuclear expression and REL amplification and crosstalk between c-Rel and the p53 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, *6*(27), 23157.
- Li, Q., & Verma, I. M. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nature reviews immunology*, *2*(10), 725-734.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J. Y., Büscher, D., Lee, K. F., Izipisua-Belmonte, J. C., & Verma, I. M. (1999). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes & development*, *13*(10), 1322-1328.
- Li, X. H., Fang, X., & Gaynor, R. B. (2001). Role of IKK γ /NEMO in assembly of the I κ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(6), 4494-4500.
- Li, X., Luo, G., Li, T., Sun, H., Wang, W., Eiler, E., ... & Chen, Y. H. (2020). The c-Rel-c-Myc axis controls metabolism and proliferation of human T leukemia cells. *Molecular immunology*, *125*, 115-122.
- Li, Y., Wang, H., Zhou, X., Xie, X., Chen, X., Jie, Z., ... & Sun, S. C. (2016). Cell intrinsic role of NF- κ B-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. *Scientific reports*, *6*(1), 22115.
- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., ... & Karin, M. (1999). The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, *189*(11), 1839-1845.
- Liang, M. C., Bardhan, S., Porco Jr, J. A., & Gilmore, T. D. (2006). The synthetic epoxyquinoids jesterone dimer and epoxyquinone A monomer induce apoptosis and inhibit REL (human c-Rel) DNA binding in an I κ B α -deficient diffuse large B-cell lymphoma cell line. *Cancer letters*, *241*(1), 69-78
- Lightman, S. M., Utley, A., & Lee, K. P. (2019). Survival of long-lived plasma cells (LLPC): piecing together the puzzle. *Frontiers in immunology*, *10*, 965.
- Lin, K. I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C., & Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology*, *22*(13), 4771-4780.
- Lin, L., DeMartino, G. N., & Greene, W. C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S proteasome. *Cell*, *92*(6), 819-828.
- Liou, H. C., & Hsia, C. Y. (2003). Distinctions between c-Rel and other NF- κ B proteins in immunity and disease. *Bioessays*, *25*(8), 767-780.
- Liu, W. R., & Shipp, M. A. (2017). Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book, 2017*(1), 310-316.

- Loder, B. F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., ... & Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor–derived signals. *The Journal of experimental medicine*, 190(1), 75-90.
- López, C., Burkhardt, B., Chan, J. K., Leoncini, L., Mbulaiteye, S. M., Ogwang, M. D., ... & Siebert, R. (2022). Burkitt lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 78.
- Lorenz, V. N., Schön, M. P., & Seitz, C. S. (2014). c-Rel downregulation affects cell cycle progression of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 415-422.
- Lorenz, V. N., Schön, M. P., & Seitz, C. S. (2014). c-Rel downregulation affects cell cycle progression of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 415-422.
- Lossos, I. S., & Gascoyne, R. D. (2011). Transformation of follicular lymphoma. *Best practice & research Clinical haematology*, 24(2), 147-163.
- Lu, H., Yang, X., Duggal, P., Allen, C. T., Yan, B., Cohen, J., ... & Weinberg, W. C. (2011). TNF- α promotes c-REL/ Δ Np63 α interaction and TAp73 dissociation from key genes that mediate growth arrest and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer research*, 71(21), 6867-6877.
- Lykken, J. M., Horikawa, M., Minard-Colin, V., Kamata, M., Miyagaki, T., Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2016). Galectin-1 drives lymphoma CD20 immunotherapy resistance: validation of a preclinical system to identify resistance mechanisms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(15), 1886-1895.
- Lyu, M. A., Cao, Y. J., Mohamedali, K. A., & Rosenblum, M. G. (2012). Cell-targeting fusion constructs containing recombinant gelonin. *Methods in enzymology*, 502, 167-214.
- Ma, K., Du, W., Wang, X., Yuan, S., Cai, X., Liu, D., ... & Lu, L. (2019). Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6021.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annual review of immunology*, 12(1), 117-139.
- Mahajan, V. S., Mattoo, H., Sun, N., Viswanadham, V., Yuen, G. J., Allard-Chamard, H., ... & Pillai, S. (2021). B1a and B2 cells are characterized by distinct CpG modification states at DNMT3A-maintained enhancers. *Nature communications*, 12(1), 2208.
- Maijer, K. I., Noort, A. R., de Hair, M. J., van der Leij, C., van Zoest, K. P., Choi, I. Y., ... & Tas, S. W. (2015). Nuclear Factor- κ B–inducing Kinase Is Expressed in Synovial Endothelial Cells in Patients with Early Arthritis and Correlates with Markers of Inflammation: A Prospective Cohort Study. *The Journal of rheumatology*, 42(9), 1573-1581.
- Mak, T. W., & Saunders, M. E. (2006). The Humoral Response: B Cell Development and Activation. *The immune response. Basic and clinical principles*. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic, 209-245.
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., ... & Dalla-Favera, R. (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell*, 18(6), 568-579.
- Mansouri, L., Thorvaldsdottir, B., Laidou, S., Stamatopoulos, K., & Rosenquist, R. (2022, September). Precision diagnostics in lymphomas—recent developments and future directions. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 84, pp. 170-183). Academic Press.
- Mårtensson, I. L., Almqvist, N., Grimsholm, O., & Bernardi, A. I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS letters*, 584(12), 2572-2579.

- Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017). Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *The Journal of Immunology*, *199*(2), 383-388.
- Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., & Fässler, R. (2006). Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF- κ B signaling. *Cell*, *125*(4), 665-677.
- Mathas, S., Hartmann, S., & Küppers, R. (2016, July). Hodgkin lymphoma: pathology and biology. In *Seminars in hematology* (Vol. 53, No. 3, pp. 139-147). WB Saunders.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., ... & Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *The EMBO journal*, *21*(15), 4104-4113.
- McCabe, M. T., Ott, H. M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G. S., ... & Creasy, C. L. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, *492*(7427), 108-112.
- McDonnell, T. J., & Korsmeyer, S. J. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t (14; 18). *Nature*, *349*(6306), 254-256.
- McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., & Korsmeyer, S. J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, *57*(1), 79-88.
- McHeyzer-Williams, L. J., Milpied, P. J., Okitsu, S. L., & McHeyzer-Williams, M. G. (2015). Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nature immunology*, *16*(3), 296-305.
- McInnes, I. B., & O'Dell, J. R. (2010). State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, *69*(11), 1898-1906.
- McManus, S., Ebert, A., Salvagiotto, G., Medvedovic, J., Sun, Q., Tamir, I., ... & Busslinger, M. (2011). The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *The EMBO journal*, *30*(12), 2388-2404.
- Metz, M., & Maurer, M. (2007). Mast cells—key effector cells in immune responses. *Trends in immunology*, *28*(5), 234-241.
- Meyer, S. N., Koul, S., & Pasqualucci, L. (2021). Mouse Models of Germinal Center Derived B-Cell Lymphomas. *Frontiers in Immunology*, *12*, 710711.
- Meyer, S. N., Scuoppo, C., Vlasevska, S., Bal, E., Holmes, A. B., Holloman, M., ... & Pasqualucci, L. (2019). Unique and shared epigenetic programs of the CREBBP and EP300 acetyltransferases in germinal center B cells reveal targetable dependencies in lymphoma. *Immunity*, *51*(3), 535-547.
- Miao, Y., Medeiros, L. J., Li, Y., Li, J., & Young, K. H. (2019). Genetic alterations and their clinical implications in DLBCL. *Nature reviews Clinical oncology*, *16*(10), 634-652.
- Miller, J. F. (2011). The golden anniversary of the thymus. *Nature Reviews Immunology*, *11*(7), 489-495.
- Miller, J. P., & Mitchell, G. F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response: I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, *128*(4), 801-820.
- Mirzaei, S., Zarrabi, A., Hashemi, F., Zabolian, A., Saleki, H., Ranjbar, A., ... & Sethi, G. (2021). Regulation of Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis?. *Cancer Letters*, *509*, 63-80.

- Mitchell, G., & Miller, J. F. A. P. (1968). Cell to cell interaction in the immune response: II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 128(4), 821-837.
- Miyamoto, S., Schmitt, M. J., & Verma, I. M. (1994). Qualitative changes in the subunit composition of kappa B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 5056-5060.
- Mo, C. C., Yee, A. J., Midha, S., Hartley-Brown, M. A., Nadeem, O., O'Donnell, E. K., ... & Richardson, P. G. (2023). Selinexor: Targeting a novel pathway in multiple myeloma. *eJHaem*.
- Mondello, P., Tadros, S., Teater, M., Fontan, L., Chang, A. Y., Jain, N., ... & Green, M. R. (2020). Selective inhibition of HDAC3 targets synthetic vulnerabilities and activates immune surveillance in lymphoma. *Cancer discovery*, 10(3), 440-459.
- Monroe, J. G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 283-294.
- Montgomery, R. A., Tatapudi, V. S., Leffell, M. S., & Zachary, A. A. (2018). HLA in transplantation. *Nature reviews nephrology*, 14(9), 558-570.
- Morath, A., & Schamel, W. W. (2020). $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors: Similar but different. *Journal of leukocyte biology*, 107(6), 1045-1055.
- Morgan, D., & Tergaonkar, V. (2022). Unraveling B cell trajectories at single cell resolution. *Trends in Immunology*.
- Mori, S., Rempel, R. E., Chang, J. T., Yao, G., Lagoo, A. S., Potti, A., ... & Nevins, J. R. (2008). Utilization of pathway signatures to reveal distinct types of B lymphoma in the E μ -myc model and human diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer research*, 68(20), 8525-8534.
- Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., ... & Marra, M. A. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics*, 42(2), 181-185.
- Morin, R. D., Mendez-Lago, M., Mungall, A. J., Goya, R., Mungall, K. L., Corbett, R. D., ... & Marra, M. A. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 476(7360), 298-303.
- Mulloy, J. C. (2010). Peripheral T cell lymphoma: new model+ new insight. *The Journal of experimental medicine*, 207(5), 911.
- Muppidi, J. R., Schmitz, R., Green, J. A., Xiao, W., Larsen, A. B., Braun, S. E., ... & Cyster, J. G. (2014). Loss of signalling via G α 13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature*, 516(7530), 254-258.
- Muris, J. J. F., Meijer, C. J. L. M., Vos, W., Van Krieken, J. H. J. M., Jiwa, N. M., Ossenkoppele, G. J., & Oudejans, J. J. (2006). Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 208(5), 714-723.
- Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K. L., Ikebe, D., ... & Igarashi, K. (2010). Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *The EMBO journal*, 29(23), 4048-4061.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), 107-116.

- Nakagawa, M. M., & Rathinam, C. V. (2018). Constitutive activation of the canonical NF- κ B Pathway leads to bone marrow failure and induction of erythroid signature in hematopoietic stem cells. *Cell reports*, 25(8), 2094-2109.
- Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 281-294.
- Ngo, V. N., Davis, R. E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., ... & Staudt, L. M. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 441(7089), 106-110.
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K. H., ... & Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-119.
- Nie, K., Zhang, T., Allawi, H., Gomez, M., Liu, Y., Chadburn, A., ... & Tam, W. (2010). Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: a potential role of the microRNA let-7. *The American journal of pathology*, 177(3), 1470-1479.
- Nieuwenhuis, P., & Opstelten, D. (1984). Functional anatomy of germinal centers. *American journal of anatomy*, 170(3), 421-435.
- Nitta, T., Murata, S., Ueno, T., Tanaka, K., & Takahama, Y. (2008). Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Advances in immunology*, 99, 59-94.
- Norrby K. Mast cells and angiogenesis. *APMIS* (2002) 110(5):355–71.
- Noto, C. N., Hoft, S. G., & DiPaolo, R. J. (2021). Mast cells as important regulators in autoimmunity and cancer development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 752350.
- Novack, D. V. (2011). Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell research*, 21(1), 169-182.
- Nowakowski, G. S., & Czuczman, M. S. (2015). ABC, GCB, and double-hit diffuse large B-cell lymphoma: does subtype make a difference in therapy selection?. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 35(1), e449-e457.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., & Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*, 401(6753), 556-562.
- Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A., & Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes & development*, 11(4), 476-491.
- Nutt, Stephen L., et al. "The generation of antibody-secreting plasma cells." *Nature Reviews Immunology* 15.3 (2015): 160-171.
- Nyman, H., Jerkeman, M., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Banham, A. H., & Leppä, S. (2009). Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Modern pathology*, 22(8), 1094-1101.
- Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C. G., Bath, M. L., Harris, A. W., & Adams, J. M. (1999). Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 14943-14948.
- Okosun, J., Bődör, C., Wang, J., Araf, S., Yang, C. Y., Pan, C., ... & Fitzgibbon, J. (2014). Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nature genetics*, 46(2), 176-181.

- Okosun, J., Wolfson, R. L., Wang, J., Araf, S., Wilkins, L., Castellano, B. M., ... & Fitzgibbon, J. (2016). Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. *Nature genetics*, *48*(2), 183-188.
- Oricchio, E., Nanjangud, G., Wolfe, A. L., Schatz, J. H., Mavrakis, K. J., Jiang, M., ... & Wendel, H. G. (2011). The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell*, *147*(3), 554-564.
- Ortega-Molina, A., Boss, I. W., Canela, A., Pan, H., Jiang, Y., Zhao, C., ... & Wendel, H. G. (2015). The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature medicine*, *21*(10), 1199-1208.
- Ortega-Molina, A., Boss, I. W., Canela, A., Pan, H., Jiang, Y., Zhao, C., ... & Wendel, H. G. (2015). The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature medicine*, *21*(10), 1199-1208.
- Ortega-Molina, A., Deleyto-Seldas, N., Carreras, J., Sanz, A., Lebrero-Fernández, C., Menéndez, C., ... & Efeyan, A. (2019). Oncogenic Rag GTPase signalling enhances B cell activation and drives follicular lymphoma sensitive to pharmacological inhibition of mTOR. *Nature metabolism*, *1*(8), 775-789.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., & Beg, A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF- κ B subunits. *Immunity*, *16*(2), 257-270.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., ... & Igarashi, K. (1996). Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Molecular and cellular biology*, *16*(11), 6083-6095.
- Palm, A. K. E., & Henry, C. (2019). Remembrance of things past: long-term B cell memory after infection and vaccination. *Frontiers in immunology*, 1787.
- Palm, A. K. E., & Kleinau, S. (2021). Marginal zone B cells: from housekeeping function to autoimmunity?. *Journal of Autoimmunity*, *119*, 102627.
- Palmer, E. (2003). Negative selection—clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology*, *3*(5), 383-391.
- Pape, K. A., Taylor, J. J., Maul, R. W., Gearhart, P. J., & Jenkins, M. K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science*, *331*(6021), 1203-1207.
- Park, H. S., McIntosh, L., Braschi-Amirfarzan, M., Shinagare, A. B., & Krajewski, K. M. (2017). T-cell non-Hodgkin lymphomas: spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes. *Korean Journal of Radiology*, *18*(1), 71-83.
- Parker, K. H., Beury, D. W., & Ostrand-Rosenberg, S. (2015). Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Advances in cancer research*, *128*, 95-139.
- Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2018). Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *131*(21), 2307-2319.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., ... & Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nature genetics*, *40*(1), 108-112.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., ... & Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine*, *203*(2), 311-317.

- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., ... & Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine*, 203(2), 311-317.
- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., ... & Dalla-Favera, R. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*, 471(7337), 189-195.
- Pasqualucci, L., Khiabani, H., Fangazio, M., Vasishtha, M., Messina, M., Holmes, A. B., ... & Dalla-Favera, R. (2014). Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell reports*, 6(1), 130-140.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R. S. K., & Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(8), 2914-2923.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., ... & Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11816-11821.
- Patel, A. M., Liu, Y. S., Davies, S. P., Brown, R. M., Kelly, D. A., Scheel-Toellner, D., ... & Stamataki, Z. (2021). The role of B cells in adult and paediatric liver injury. *Frontiers in immunology*, 12, 729143.
- Paun, A., Claudio, E., & Siebenlist, U. K. (2021). Constitutive activation of NF- κ B during early bone marrow development results in loss of B cells at the pro-B-cell stage. *Blood advances*, 5(3), 745-755.
- Pelanda, R., & Torres, R. M. (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(4), a007146.
- Pende, D., Falco, M., Vitale, M., Cantoni, C., Vitale, C., Munari, E., ... & Moretta, L. (2019). Killer Ig-like receptors (KIRs): their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Frontiers in immunology*, 10, 1179.
- Percy, D. H., & Barthold, S. W. (2013). *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. John Wiley & Sons.
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., ... & Orfao, A. MBL PRIMARY HEALTH CARE GROUP OF SALAMANCA FOR THE STUDY OF (2010) Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 78.
- Pérez-Vera, P., Reyes-León, A., & Fuentes-Pananá, E. M. (2011). Signaling proteins and transcription factors in normal and malignant early B cell development. *Bone marrow research*, 2011.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), 49-62.
- Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 121-132.
- Petro, J. B., Gerstein, R. M., Lowe, J., Carter, R. S., Shinnars, N., & Khan, W. N. (2002). Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48009-48019.

- Pfeiffer, R.Z. *Hyg. Infektskr.* **18**, 1–16 (1895). Jules Bordet would later show that both bacteriolysis and hemolysis are due to the action of two substances, humoral antibody and complement; *Ann. Inst. Pasteur* **12**, 688–695 (1989)
- Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lin-Lee, Y. C., & Ford, R. J. (2005). Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood*, 106(12), 3940-3947
- Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., & Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature immunology*, 6(10), 1054-1060.
- Pohl, T., Gugasyan, R., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Tarlinton, D., ... & Gerondakis, S. (2002). The combined absence of NF- κ B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4514-4519.
- Pulvertaft, R. J. V. (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*, 238-40.
- Qin, W., Kutny, P. M., Maser, R. S., Dion, S. L., Lamont, J. D., Zhang, Y., ... & Wang, H. (2016). Generating mouse models using CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Current protocols in mouse biology*, 6(1), 39-66.
- Queen, C., & Baltimore, D. (1983). Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell*, 33(3), 741-748.
- Quentmeier, H., Pommerenke, C., Dirks, W. G., Eberth, S., Koeppel, M., MacLeod, R. A., ... & Drexler, H. G. (2019). The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Scientific Reports*, 9(1), 8218.
- Rahman, M. M., & McFadden, G. (2011). Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 291-306.
- Re, B. (1953). 'Actively Acquired Tolerance' of Foreign Cells. *Nature*, 172(4379), 603-606.
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N. S., Moffitt, A. B., Love, C. L., Waldrop, A., ... & Dave, S. S. (2017). Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma. *Cell*, 171(2), 481-494.
- Reichardt, P., Dornbach, B., Rong, S., Beissert, S., Gueler, F., Loser, K., & Gunzer, M. (2007). Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110(5), 1519-1529.
- Reid, R., & Friedberg, J. W. (2013). Management of marginal zone lymphoma. *Oncology*, 27(9), 840.
- Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., & Cyster, J. G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416(6876), 94-99.
- Richmond, A., & Su, Y. (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease models & mechanisms*, 1(2-3), 78-82.
- Roche, J. (2018). The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cancers*, 10(2), 52.
- Rojek, A. E., & Smith, S. M. (2022). Evolution of therapy for limited stage diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 12(2), 33.
- Ronin, E., Lubrano di Ricco, M., Vallion, R., Divoux, J., Kwon, H. K., Grégoire, S., ... & Salomon, B. L. (2019). The NF- κ B RelA transcription factor is critical for regulatory T cell activation and stability. *Frontiers in immunology*, 10, 2487.

- Roschewski, M., Phelan, J. D., & Wilson, W. H. (2020). Molecular classification and treatment of diffuse large B-cell lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 26(3), 195.
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma—treatment approaches in the molecular era. *Nature reviews Clinical oncology*, 11(1), 12-23.
- Rosenthal, N., & Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology*, 9(9), 993-999.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., ... & Staudt, L. M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937-1947.
- Roussel, M., Bartkowiak, T., & Irish, J. M. (2019). Picturing polarized myeloid phagocytes and regulatory cells by mass cytometry. *Mass Cytometry: Methods and Protocols*, 217-226.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., & Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Molecular and cellular biology*.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P. M., Bhagat, G., ... & Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer cell*, 12(3), 280-292.
- Sapkota, S., & Shaikh, H. (2020). Non-Hodgkin Lymphoma.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., & Baltimore, D. (1989). The V (D) J recombination activating gene, Rag-1. *Cell*, 59(6), 1035-1048.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvaggio, G., Delogu, A., Busslinger, G. A., & Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*, 27(1), 49-63.
- Schijns, V., Majhen, D., Van Der Ley, P., Thakur, A., Summerfield, A., Berisio, R., ... & McClean, S. (2021). Rational vaccine design in times of emerging diseases: The critical choices of immunological correlates of protection, vaccine antigen and immunomodulation. *Pharmaceutics*, 13(4), 501.
- Schlee, M., Krug, T., Gires, O., Zeidler, R., Hammerschmidt, W., Mailhammer, R., ... & Bornkamm, G. W. (2004). Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis: activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV. *Journal of virology*, 78(8), 3941-3952.
- Schmidlin, H., Diehl, S. A., Nagasawa, M., Scheeren, F. A., Schotte, R., Uittenbogaart, C. H., ... & Blom, B. (2008). Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(5), 1804-1812.
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., ... & Staudt, L. M. (2018). Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1396-1407.
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., ... & Staudt, L. M. (2018). Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1396-1407.
- Schneider, C., Kon, N., Amadori, L., Shen, Q., Schwartz, F. H., Tischler, B., ... & Dalla-Favera, R. (2016). FBXO11 inactivation leads to abnormal germinal-center formation and

- lymphoproliferative disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(5), 660-666.
- Schneider, C., Kon, N., Amadori, L., Shen, Q., Schwartz, F. H., Tischler, B., ... & Dalla-Favera, R. (2016). FBXO11 inactivation leads to abnormal germinal-center formation and lymphoproliferative disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(5), 660-666.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., ... & Küppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(4), 1505-1512.
- Sekiya, Y., Yamamoto, E., Niimi, K., Nishino, K., Nakamura, K., Kotani, T., ... & Kikkawa, F. (2017). c-Rel promotes invasion of choriocarcinoma cells via PI3K/AKT signaling. *Oncology*, 92(5), 299-310.
- Sen, J., Venkataraman, L., Shinkai, Y., Pierce, J. W., Alt, F. W., Burakoff, S. J., & Sen, R. (1995). Expression and induction of nuclear factor-kappa B-related proteins in thymocytes. *The Journal of Immunology*, 154(7), 3213-3221.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *cell*, 46(5), 705-716.
- Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V., & Karin, M. (2001). IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity*, 14(3), 217-230.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., ... & Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, 17(1), 51-62.
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Qian, S. B., Zhao, H., ... & Staudt, L. M. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21(1), 81-93.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., & Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13(2), 199-212.
- Sharpless, N. E., & DePinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature reviews Drug discovery*, 5(9), 741-754.
- Shay, T., Jojic, V., Zuk, O., Rothamel, K., Puyraimond-Zemmour, D., Feng, T., ... & ImmGen Consortium. (2013). Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 2946-2951.
- Shembade, N., & Harhaj, E. W. (2012). Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cellular & molecular immunology*, 9(2), 123-130.
- Sheng, L., Zhou, Y., Chen, Z., Ren, D., Cho, K. W., Jiang, L., ... & Rui, L. (2012). NF- κ B-inducing kinase (NIK) promotes hyperglycemia and glucose intolerance in obesity by augmenting glucagon action. *Nature medicine*, 18(6), 943-949.
- Shifera, A. S. (2010). The zinc finger domain of IKK γ (NEMO) protein in health and disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(10), 2404-2414.

- Shimkus, G., & Nonaka, T. (2023). Molecular classification and therapeutics in diffuse large B-cell lymphoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10.
- Siden, E., Alt, F. W., Shinefeld, L., Sato, V., & Baltimore, D. (1981). Synthesis of immunoglobulin mu chain gene products precedes synthesis of light chains during B-lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3), 1823-1827.
- Sil, A. K., Maeda, S., Sano, Y., Roop, D. R., & Karin, M. (2004). I κ B kinase- α acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature*, 428(6983), 660-664.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., & Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, 319, 154-158.
- Siraganian, R. P. (2003). Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Current opinion in immunology*, 15(6), 639-646.
- Skaar, J. R., Pagan, J. K., & Pagano, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(6), 369-381.
- Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., & Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(2), 618-626.
- Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., & Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 8(3), 363-372.
- Smith, A., Crouch, S., Lax, S., Li, J., Painter, D., Howell, D., ... & Roman, E. (2015). Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *British journal of cancer*, 112(9), 1575-1584.
- Smith, A., Scott, J., & Boyes, J. (2019). The ESC: The Dangerous By-Product of V (D) J Recombination. *Frontiers in immunology*, 10, 1572.
- Smith, K. G., Hewitson, T. D., Nossal, G. J. V., & Tarlinton, D. M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *European journal of immunology*, 26(2), 444-448.
- Son, J. S., Sahoo, A., Chae, C. S., Hwang, J. S., Park, Z. Y., & Im, S. H. (2011). JunB and c-Rel cooperatively enhance Foxp3 expression during induced regulatory T cell differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 407(1), 141-147.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics*, 21(1), 70-71.
- Souroullas, G. P., Jeck, W. R., Parker, J. S., Simon, J. M., Liu, J. Y., Paulk, J., ... & Sharpless, N. E. (2016). An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. *Nature medicine*, 22(6), 632-640.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., & Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology*, 1, 1-8.
- Sriskandarajah, P., & Dearden, C. E. (2017). Epidemiology and environmental aspects of marginal zone lymphomas. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 30(1-2), 84-91.
- Stavnezer, J., & Schrader, C. E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *The Journal of Immunology*, 193(11), 5370-5378.

- Stavnezer, J., & Schrader, C. E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *The Journal of Immunology*, *193*(11), 5370-5378.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.*, *26*, 261-292.
- Steidl, C., Telenius, A., Shah, S. P., Farinha, P., Barclay, L., Boyle, M., ... & Gascoyne, R. D. (2010). Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *116*(3), 418-427.
- Stein H, Lennert K, Feller AC, Mason DY. Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. *Adv Cancer Res*. 1984;42:67-147. doi:10.1016/s0065-230x(08)60456-x
- Stein, S. J., & Baldwin, A. S. (2013). Deletion of the NF- κ B subunit p65/RelA in the hematopoietic compartment leads to defects in hematopoietic stem cell function. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *121*(25), 5015-5024.
- Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C., Knight, J., Weale, M. E., Allen, M. H., ... & Blackwell, J. M. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature genetics*, *42*(11), 985.
- Streubel, B., Vinatzer, U., Lamprecht, A., Raderer, M., & Chott, A. T. (2005). T (3; 14)(p14. 1; q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia*, *19*(4), 652-658.
- Streubel, B., Vinatzer, U., Willheim, M., Raderer, M., & Chott, A. (2006). Novel t (5; 9)(q33; q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*, *20*(2), 313-318.
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell research*, *21*(1), 71-85.
- Sun, S. C., & Ballard, D. W. (1999). Persistent activation of NF- κ B by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular I κ B kinases. *Oncogene*, *18*(49), 6948-6958.
- Susanibar-Adaniya, S., & Barta, S. K. (2021). 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *American journal of hematology*, *96*(5), 617-629.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., ... & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(20), 2375-2390.
- Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., ... & Seto, M. (2005). Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *106*(5), 1770-1777.
- Takemori, T., Tarlinton, D., Hiepe, F., & Andreas, R. (2014). B cell memory and plasma cell development. In *Molecular Biology of B cells* (pp. 227-249). Academic Press.
- Tam, W., Gomez, M., Chadburn, A., Lee, J. W., Chan, W. C., & Knowles, D. M. (2006). Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, *107*(10), 4090-4100.
- Tam, W., Gomez, M., Chadburn, A., Lee, J. W., Chan, W. C., & Knowles, D. M. (2006). Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, *107*(10), 4090-4100.
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, *18*(5), 309-324.

- Tellier, J., & Nutt, S. L. (2019). Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *European journal of immunology*, 49(1), 30-37.
- Thomas, L. R., Cobb, R. M., & Oltz, E. M. (2009). Dynamic regulation of antigen receptor gene assembly. *V (D) J Recombination*, 103-115.
- Tian, W., & Liou, H. C. (2009). RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo. *PloS one*, 4(4).
- Tonegawa, S. (1988). Somatic generation of immune diversity. *Bioscience reports*, 8, 3-26.
- Tooze, Reuben M. "A replicative self-renewal model for long-lived plasma cells: questioning irreversible cell cycle exit." *Frontiers in immunology* 4 (2013): 460.
- Traenckner, E. M., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., & Baeuerle, P. A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *The EMBO journal*, 14(12), 2876-2883.
- Treuting, P. M., Dintzis, S., & Montine, K. S. (Eds.). (2017). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A. L., Angelin-Duclos, C. D., Yu, X., Staudt, L. M., & Calame, K. L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *The Journal of Immunology*, 173(2), 1158-1165.
- Turpin, P., Hay, R. T., & Dargemont, C. (1999). Characterization of Ikb α nuclear import pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6804-6812.
- Tweeddale, M., Jamal, N., Nguyen, A., Wang, X. H., Minden, M. D., & Messner, H. A. (1989). Production of growth factors by malignant lymphoma cell lines.
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27, 693-733.
- Valls, E., Lobry, C., Geng, H., Wang, L., Cardenas, M., Rivas, M., ... & Melnick, A. (2017). BCL6 Antagonizes NOTCH2 to Maintain Survival of Human Follicular Lymphoma Cells Targeting BCL6 in Follicular Lymphoma. *Cancer discovery*, 7(5), 506-521.
- van den Brand, M., van der Velden, W. J., Diets, I. J., Ector, G. I., de Haan, A. F., Stevens, W. B., ... & van Krieken, H. J. (2016). Clinical features of patients with nodal marginal zone lymphoma compared to follicular lymphoma: similar presentation, but differences in prognostic factors and rate of transformation. *Leukemia & Lymphoma*, 57(7), 1649-1656.
- Vantourout, P., & Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 88-100.
- Varghese, M. T., & Alsubait, S. (2021). T-Cell Lymphoma. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Veglia, F., Perego, M., & Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature immunology*, 19(2), 108-119.
- Veglia, F., Sanseviero, E., & Gabrilovich, D. I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, 21(8), 485-498.
- Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T., & Eberl, M. (2018, December). $\gamma\delta$ T cell responses: How many ligands will it take till we know?. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 84, pp. 75-86). Academic Press.

- Victora, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2022). Germinal centers. *Annual review of immunology*, 40, 413-442.
- Victora, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., & Nussenzweig, M. C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(11), 2240-2248.
- Victora, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., & Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 143(4), 592-605.
- Visco, C., Tzankov, A., Xu-Monette, Z. Y., Miranda, R. N., Tai, Y. C., Li, Y., ... & Young, K. H. (2013). Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*, 98(2), 255.
- von Boehmer, H., & Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annual review of immunology*, 15(1), 433-452.
- Wang, H., & Hogquist, K. A. (2018). How lipid-specific T cells become effectors: the differentiation of iNKT subsets. *Frontiers in immunology*, 9, 1450.
- Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Humburg, P., Batchelor, E. L., Kaya, S. M., Yoo, H. M., ... & Horikawa, K. (2017). Synergistic cooperation and crosstalk between MYD88L265P and mutations that dysregulate CD79B and surface IgM. *Journal of Experimental Medicine*, 214(9), 2759-2776.
- Wang, J., Jacob, N. K., Ladner, K. J., Beg, A., Perko, J. D., Tanner, S. M., ... & Guttridge, D. C. (2009). RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO reports*, 10(11), 1272-1278.
- Wang, L., Li, L. R., & Young, K. H. (2020). New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology*, 13, 1-23.
- Wang, N., & Zhu, H. Y. (2021). Research Status of TPO/c-MPL Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia--Review. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 29(4), 1351-1354.
- Wang, W., Tam, W. F., Hughes, C. C., Rath, S., & Sen, R. (1997). c-Rel is a target of pentoxifylline-mediated inhibition of T lymphocyte activation. *Immunity*, 6(2), 165-174.
- Wang, X., Li, Z., Naganuma, A., & Ye, B. H. (2002). Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15018-15023.
- Wang, X., Peng, H., Huang, Y., Kong, W., Cui, Q., Du, J., & Jin, H. (2020). Post-translational modifications of IκBα: the state of the art. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 574706.
- Wang, Y., Rickman, B. H., Poutahidis, T., Schlieper, K., Jackson, E. A., Erdman, S. E., ... & Horwitz, B. H. (2008). c-Rel is essential for the development of innate and T cell-induced colitis. *The Journal of Immunology*, 180(12), 8118-8125.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... & Brown, S. D. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520.

- Weih, F., Warr, G., Yang, H., & Bravo, R. (1997). Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *158*(11), 5211-5218.
- Weih, F., Warr, G., Yang, H., & Bravo, R. (1997). Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *158*(11), 5211-5218.
- Weisenburger, D. D., Kim, H., & Rappaport, H. (1982). Mantle-zone lymphoma: A follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer*, *49*(7), 1429-1438.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, *287*(5457), 1442-1446.
- Weniger, M. A., & Küppers, R. (2016, August). NF- κ B deregulation in Hodgkin lymphoma. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 39, pp. 32-39). Academic Press.
- Weniger, M. A., & Küppers, R. (2021). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, *35*(4), 968-
- Whiteside, S. T., Ernst, M. K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N., & Israël, A. (1995). N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/l kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity. *Molecular and cellular biology*, *15*(10), 5339-5345.
- Wienands, J., & Engels, N. (2016). The memory function of the B cell antigen receptor. *B Cell Receptor Signaling*, 107-121.
- William, C. S., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., & Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, *80*(2), 321-330.
- Winkler, T. H., & Mårtensson, I. L. (2018). The role of the pre-B cell receptor in B cell development, repertoire selection, and tolerance. *Frontiers in immunology*, *9*, 2423.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A., & Staudt, L. M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(17), 9991-9996.
- Wright, George W., et al. "A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications." *Cancer cell* 37.4 (2020): 551-568.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R., & Shortman, K. (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *The Journal of experimental medicine*, *174*(6), 1617-1627.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K. D., Suter, M., Lo, D., & Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8 α - dendritic cells but not of lymphoid-related CD8 α + dendritic cells. *Immunity*, *9*(6), 839-847.
- Wu, Y., & Song, H. (2022). A comparative and comprehensive review of antibody applications in the treatment of lung disease. *Life*, *12*(1), 130.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., ... & Rao, A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, *126*(2), 375-387.
- Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M., & Sun, S. C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF- κ B2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKK α . *The EMBO journal*, *20*(23), 6805-6815.
- Xie, P., Stunz, L. L., Larison, K. D., Yang, B., & Bishop, G. A. (2007). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity*, *27*(2), 253-267.

- Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T., & Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology*, *12*(7), 517-531.
- Xu-Monette, Z. Y., Deng, Q., Manyam, G. C., Tzankov, A., Li, L., Xia, Y., ... & Young, K. H. (2016). Clinical and biologic significance of MYC genetic mutations in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*, *22*(14), 3593-3605.
- Xu-Monette, Z. Y., Wu, L., Visco, C., Tai, Y. C., Tzankov, A., Liu, W. M., ... & Young, K. H. (2012). Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *120*(19), 3986-3996.
- Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., & Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, *423*(6940), 655-659.
- Yamashita, M., Kohli, L., Warr, M., & Passegué, E. (2016). Hematopoietic stem cells are protected by NF- κ B Pro-survival signals from TNFA-driven necroptosis. *Experimental Hematology*, *44*(9), S50.
- Yang, X., Lu, H., Yan, B., Romano, R. A., Bian, Y., Friedman, J., ... & Si, H. (2011). Δ Np63 versatilely regulates a Broad NF- κ B gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation. *Cancer research*, *71*(10), 3688-3700.
- Yanguas-Casás, N., Pedrosa, L., Fernández-Miranda, I., & Sánchez-Beato, M. (2021). An overview on diffuse large B-cell lymphoma models: towards a functional genomics approach. *Cancers*, *13*(12), 2893.
- Ye, B. H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S. K., & Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*, *262*(5134), 747-750.
- Yee, C. S., Messner, H. A., & Minden, M. D. (1991). Regulation of interleukin-6 expression in the lymphoma cell line OCI-LY3. *Journal of cellular physiology*, *148*(3), 426-429.
- Ying, C. Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I. C., Hussein, S., Bansal, M., ... & Dalla-Favera, R. (2013). MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nature immunology*, *14*(10), 1084-1092.
- Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., & Hoyer, B. F. (2010). Memory B and memory plasma cells. *Immunological reviews*, *237*(1), 117-139.
- Young, R. M., & Staudt, L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature reviews Drug discovery*, *12*(3), 229-243.
- Young, R. M., Hardy, I. R., Clarke, R. L., Lundy, N., Pine, P., Turner, B. C., ... & Refaeli, Y. (2009). Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *113*(11), 2508-2516.
- Yu, J., Zhou, X., Nakaya, M., Jin, W., Cheng, X., & Sun, S. C. (2014). T cell-intrinsic function of the noncanonical NF- κ B pathway in the regulation of GM-CSF expression and experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *The Journal of Immunology*, *193*(1), 422-430.
- Yusufova, N., Kloetgen, A., Teater, M., Osunsade, A., Camarillo, J. M., Chin, C. R., ... & Melnick, A. M. (2021). Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature*, *589*(7841), 299-305.

- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., & Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(8), 3789-3794.
- Zawil, L., Marchiol, T., Brauge, B., Saintamand, A., Carrion, C., Dessauge, E., ... & Cogné, M. (2022). Distinct B-Cell Specific Transcriptional Contexts of the BCL2 Oncogene Impact Pre-Malignant Development in Mouse Models. *Cancers*, *14*(21), 5337.
- Zhang, B., Calado, D. P., Wang, Z., Fröhler, S., Köchert, K., Qian, Y., ... & Rajewsky, K. (2015). An oncogenic role for alternative NF- κ B signaling in DLBCL revealed upon deregulated BCL6 expression. *Cell reports*, *11*(5), 715-726.
- Zhang, J., Gu, Y., & Chen, B. (2023). Drug-Resistance Mechanism and New Targeted Drugs and Treatments of Relapse and Refractory DLBCL. *Cancer Management and Research*, 245-255.
- Zhang, J., Vlasevska, S., Wells, V. A., Nataraj, S., Holmes, A. B., Duval, R., ... & Pasqualucci, L. (2017). The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma Dose-Dependent Control of Lymphomagenesis by CREBBP. *Cancer discovery*, *7*(3), 322-337.
- Zhang, J., Vlasevska, S., Wells, V. A., Nataraj, S., Holmes, A. B., Duval, R., ... & Pasqualucci, L. (2017). The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma Dose-Dependent Control of Lymphomagenesis by CREBBP. *Cancer discovery*, *7*(3), 322-337.
- Zhang, M. Y., Sun, S. C., Bell, L., & Miller, B. A. (1998). NF- κ B transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *91*(11), 4136-4144.
- Zhang, Y., Kim, C., & Zheng, T. (2012). Hair dye use and risk of human cancer. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, *4*, 516.
- Zheng, B., Yang, Y., Chen, L., Wu, M., & Zhou, S. (2022). B-cell receptor repertoire sequencing: Deeper digging into the mechanisms and clinical aspects of immune-mediated diseases. *Science*, 105002.
- Zhu, Y., Yao, S., & Chen, L. (2011). Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*, *34*(4), 466-478.
- Zucca, E., & Bertoni, F. (2016). The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(17), 2082-2092.

Rôle de la sous-unité c-Rel NF- κ B dans les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules du Centre Germinatif (GCB-DLBCL) : établissement d'un modèle murin pré-clinique

Le facteur de transcription Rel/NF- κ B inclut 5 sous-unités (SU), p50, p52, c-Rel, RelA et RelB qui s'associent en dimères. NF- κ B est au cœur de l'ontogénie des lymphocytes B matures dans les centres germinatifs (CG) pour c-Rel et RelB et lors de la différenciation en plasmocyte pour RelA. Le lymphome diffus à grandes cellules (DLBCL) représente plus de 80% des lymphomes B agressifs. Nous avons publié que les SU NF- κ B doivent être prises en compte de façon différentielle, tel que RelB est un marqueur de mauvais pronostic, RelA est la SU du sous-type moléculaire ABC (activated B cell) et cRel celle des GCB (germinal center B cell)-DLBCL avec une signature transcriptomique nouvelle propre. Le présent projet consiste à comprendre mécaniquement comment c-Rel induit la transformation d'un lymphocyte B du CG. Nous avons établi un nouveau modèle murin de surexpression de c-Rel (avec YFP) dans quelques lymphocytes B du CG (tdTomato-AID-Creert2) et testons l'émergence clonale d'une tumeur. L'originalité de ce modèle inductible tient au fait qu'il permet de suivre la compétition entre les B des CG surexprimant c-Rel (tdTomato et YFP) par rapport à leur contrepartie normale (tdTomato).

Mots-clés : GCB-DLBCL, Modèle murin, NF- κ B, Surexpression, REL, DLBCL

Role of c-Rel NF- κ B subunit in Germinal Center Diffuse Large B Cell Lymphoma (GCB-DLBCL): establishment of a preclinical murine model

The transcription factor Rel/NF- κ B includes 5 subunits (SU), p50, p52, c-Rel, RelA and RelB which associate into dimers. NF- κ B is at the heart of the ontogeny of mature B lymphocytes in the germinal centers (GC) for c-Rel and RelB and during plasma cell differentiation for RelA. Diffuse large cell lymphoma (DLBCL) represent more than 80% of aggressive B-cell lymphomas. We have published that NF- κ B SUs must be taken into account differentially, such that RelB is a marker of poor prognosis, RelA is the SU of the ABC molecular subtype (activated B cell) and cRel that of GCB (germinal center B cell)-DLBCL with a novel clean transcriptomic signature. This project consists of understanding mechanistically how c-Rel induces the transformation of a GC B lymphocyte. We have established a new mouse model of c-Rel overexpression (with YFP) in some CG B lymphocytes (tdTomato-AID-Creert2) and are testing the clonal emergence of a tumor. The originality of this inducible model relies in the fact that it makes it possible to follow the competition between the B of the GCs on expressed c-Rel (tdTomato and YFP) compared to their normal counterpart (tdTomato).

Keywords : GCB-DLBCL, Murine model, NF- κ B, Overexpression, REL, DLBCL

