Caractérisation de nouveaux régulateurs de l'activation lymphocytaire et de la lymphomagenèse

Sonia Dubois

▶ **To cite this version:**

Sonia Dubois. Caractérisation de nouveaux régulateurs de l'activation lymphocytaire et de la lymphomagenèse. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T033 . tel-01502520

HAL Id: tel-01502520
https://theses.hal.science/tel-01502520

Submitted on 5 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 : Cancérologie - Biologie, Médecine, Santé

Laboratoire : *Institut Cochin, unité mixte de recherche INSERM U1016 et CNRS UMR8104*

Département Infection, Immunité, Inflammation

Discipline : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thèse de Doctorat

par

Sonia DUBOIS

Date de soutenance : 2 juillet 2015

Caractérisation de nouveaux régulateurs de l'activation lymphocytaire et de la lymphomagenèse

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Dr Nicolas Bidère	CR1 (Institut Cochin)
Président du jury :	Pr Pierre Bobé	PU (SCICF Orsay)
Rapporteurs :	Pr Capucine Picard	PU-PH (Institut Imagine)
	Dr Florence Niedergang	DR2 (Institut Cochin)
Examinateurs :	Dr Claire Hivroz	DR2 (Institut Curie)
	Dr Sylvain Latour	DR1 (Institut Imagine)

A ma famille qui m'encourage

A mes copines marseillaises, toujours là pour moi

A mon futur mari qui me tire vers le haut

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les membres du jury : Florence Niedergang, Capucine Picard, Claire Hivroz, Pierre Bobé et Sylvain Latour d'avoir accepté d'évaluer mes trois années de travaux de thèse.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon directeur de thèse Nicolas Bidère. Après cinq années passées sous ta direction, il s'en est passé des choses! Je voudrais te remercier pour le plus important, c'est à dire de m'avoir transmis ta passion de la recherche et de m'avoir donné les armes nécessaires pour prendre mon envol. Je voudrais aussi rendre hommage à ton enthousiasme et ta sincérité qui ont été d'une grande aide dans des moments difficiles.

Je remercie Julie Gavard de m'avoir accueillie dans son laboratoire en juillet 2014 et grâce à qui j'ai pu faire une troisième et dernière année de thèse dans des conditions toutes autant idéales qu'agréables. Je te remercie aussi d'avoir suivi mes travaux durant ces trois ans, et pour la confiance que tu m'a accordée en me permettant de collaborer avec des membres de ton équipe. Ces interactions avec toi et ton équipe ont été très enrichissantes.

Je tiens également à remercier Pierre Olivier Couraud qui n'a pas hésité à m'accueillir au sein de l'Institut Cochin pour ma dernière année de thèse et Sandrine Bourdoulous qui m'a intégrée à son équipe de recherche.

Cathy, un grand MERCI à toi pour mes deux premières années de thèse, j'ai adoré travailler avec toi, tu m'as beaucoup appris au labo. Aussi un grand merci pour tous les bons moments passés en ta compagnie et nos longues conversations dans le L2, qui je dois l'avouer m'ont beaucoup manqué ici à Cochin!!

Je ne peux pas écrire cette page sans remercier l'équipe de Julie Gavard pour leur accueil quand je suis arrivée en juillet, et en particulier Héloïse, Lucas et Elizabeth. Cette dernière année en votre compagnie était vraiment super, que ce soit au labo, au parc du Luxembourg pour quelques footing, abdos et pique nique... (les bubules m'ont beaucoup amusée ;) ainsi que plein d'autres choses!!!).

Je remercie toutes les stagiaires que j'ai côtoyées pendant ma thèse et je vous souhaite beaucoup de succès! Aline, Claire, Emilie, Judith, Véro, Shane, Tiphaine et Sara.

Je voudrais finir par un petit clin d'oeil à l'école de l'ADN du Généthon. Claire, Maguy, Jérome : ma première année de thèse a été ponctuée de plusieurs moments enrichissants et émouvants grâce à vous. Julie et Marion : comment va-t-on faire maintenant qu'il n'y a plus Roscoff ???

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES 8

ABRÉVIATIONS 10

RÉSUMÉ 11

INTRODUCTION 13

I) Activation du facteur de transcription NF-κB par les récepteurs antigéniques 14

I.1) NF-κB : 29 ans d'histoire 15
I.2) Activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques 27

II) Les processus d'ubiquitination et leur importance dans l'activation de NF-κB 35

II.1) Mise en place des chaînes d'ubiquitine 36
II.2) Ubiquitination et activation de NF-κB en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques 41

III) Le lymphome diffus à grandes cellules B ABC DLBCL 52

III.1) Présentation du lymphome diffus à grandes cellules B 52
III.2) Dissection moléculaire du mécanisme oncogénique des ABC DLBCL 60
III.3) Quel traitement pour les ABC DLBCL? 68

IV) Objectifs de la thèse et stratégies 71

RESULTATS 75

Résumé 77

Publication majeure 79

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES 105

I) Rôle du LUBAC dans l'activation lymphocytaire et la lymphomagenèse 107

I.1) Identification de HOIP 107
I.2) Le LUBAC : un nouveau partenaire du complexe CBM 108
I.3) Le LUBAC participe à l'activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques 108
I.4) Le LUBAC : un casse tête dans l'activation lymphocytaire... 110
I.5) Le LUBAC participe à la survie des ABC DLBCL 113
I.6) Le LUBAC comme une cible thérapeutique dans le traitement des ABC DLBCL? 115

II) Identification de nouveaux partenaires du signalosome CBM-LUBAC 116

III) Caractérisation d'un inhibiteur chimique de la survie des ABC DLBCL 118

III.1) Du développement d'un principe actif à la mise sur le marché d'un médicament 118
III.2) Le repositionnement de molécules chimiques dans le cadre des ABC DLBCL 120

IV) Le mot de la fin 128

ANNEXES 131

Annexe 1 : Figures 35 and 36 experimental procudures 133

Annexe 2 : Publication secondaire 135

Annexe 3 : Publication secondaire 153

Annexe 4 : Travaux collaboratifs 170

BIBLIOGRAPHIE 175

TABLE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des membres de la famille Rel 18
Figure 2 : Les différents NF-κB 18
Figure 3 : Représentation schématique des membres de la famille des IκBs 20
Figure 4 : Rôle central de NF-κB en réponse à divers stimuli 24
Figure 5 : Composition du complexe IKK 24
Figure 6 : Voie canonique d'activation de NF-κB 26
Figure 7 : Voie non canonique d'activation de NF-κB 27
Figure 8 : Récepteurs antigéniques et réponse immunitaire adaptative 28
Figure 9 : Activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques 29
Figure 10 : Composition du complexe CBM 33
Figure 11 : Activité catalytique de MALT1 35
Figure 12 : Structure de l'ubiquitine 37
Figure 13 : Mise en place des chaînes d'ubiquitine 39
Figure 14 : Mécanisme d'ubquitination par les E3 ligases HECT, RBR et RING 40
Figure 15 : Composition du complexe SCF-βTrCP 41
Figure 16 : Le complexe LUBAC 45
Figure 17 : HOIP : relation structure/fonction 46
Figure 18 : HOIP : Mise en place des chaînes d'ubiquitine mixtes K3/linéaire en réponse à l'IL-1β 48
Figure 19 : Les DUB célèbres dans l'activation de NF-κB 51
Figure 20 : Mode d'action d'OTULIN 51
Figure 21 : Le système lymphatique 54
Figure 22 : Maturation des lymphocytes B dans le centre germinatif 58
Figure 23 : Courbe Kaplan Meier : survie globale de patients atteints de PMBL, GCB DLBCL et ABC DLBCL après leur chimiothérapie 59
Figure 24 : Statistiques des différentes mutations affectant les DLBCL : nature des mutations, mécanismes cellulaires affectés (gène ontologie) et fréquences 61
Figure 25 : Mutations oncogéniques identifiées dans la région coiled-coil de CARMA1 62
Figure 26 : Mutations oncogéniques identifiées dans les motifs ITAM de CD79A et CD79B 63
Figure 27 : Répartition des différentes mutations affectant NF-κB dans les ABC DLBCL 67
Figure 28 : Voies piratées par les ABC DLBCL et les différents inhibiteurs développés 69
Figure 29 : Implication du complexe LUBAC dans l'activation lymphocytaire et la lymphomagenèse 78
Figure 30 : LUBAC importance in lymphocytes activation 112
Figure 31 : HOIL-1 importance for NF-κB nuclear translocation in response to TCR stimulation 112

Figure 32 : Gain-of-function conferred by HOIP (RNF31) SNPs 114
Figure 33 : Identification of new CBM-LUBAC signalosome partners 117
Figure 34 : Le long périple de la découverte d'une molécule active à la mise sur le marché d'un médicament 119
Figure 35 : Compound E (C.E) induces a caspase dependent apoptosis in ABC DLBCL 125
Figure 36 : Compound E (C.E) does not impact NF-κB signaling but induces NF-ATc1 activation and toxic cytokines secretion in ABC DLBCL 126
Figure 37 : Les apports de la thèse et les questions en suspens pour les futurs doctorants... 129

Liste des tableaux

Tableau 1 : Phénotype des souris knockout pour les gènes codant la famille Rel 19
Tableau 2 : Phénotype des souris knockout pour deux ou trois gènes codant la famille Rel 19
Tableau 3 : Fonction des IκBs 23
Tableau 4 : Exemple de quelques effecteurs spécifiques des lymphocytes T et des lymphocytes B 29
Tableau 5 : Les différents types d'ubiquitination et leur implication dans les processus cellulaires 38
Tableau 6 : Les inhibiteurs récemment développés dans le traitement des ABC DBCL 70
Tableau 7 : Profil moléculaire des différentes lignées de DLBCL utilisées 122

Liste des frises chronologiques

Découverte de NF-κB 16
Caractérisation de la famille Rel 17
Caractérisation de la famille IκB 20
L'ubiquitine 36
De la première observation d'un lymphome à la classification de l'OMS en 2008 53
Addiction oncogénique des ABC DLBCL 67

ABRÉVIATIONS

A,B,C

ABC DLBCL	Activated B Cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APC	Antigen-Presenting Cell
ARN	Acide Ribo Nucléique
BAFF	B-cell Activating Factor
BCL6	B Cell Lymphoma 6
BCL10	B Cell Lymphoma 10
BCR	B Cell Receptor
DAG	Diacylglycérol
CARMA1	CARD-containing MAGUK protein1
CBM	CARM1-BCL10-MALT1
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40 Ligand

D,E,F

DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPDM	Chronic Proliferative Dermatitis
CYLD	Cyldromatosis
DUB	DeUBiquitinating enzyme
FDA	Food and Drug Administration

G,H,I

GCB DLBCL	Germinal Center B cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma
HECT	Homology to E6AP C Terminus
HN	Head and Neck
HOIL-1	Heme-Oxidized Iron-regulatory protein 2 ubiquitin Ligase-1
HOIP	HOIL Interacting Protein
HSP	Heat Shock Protein
IBR	In Between RING
IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
ITAM	Immunomoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs

J,K,L

JAMM	JAB1/MPN/Mov37 Metalloproteases
LDD	Linear Ubiquitin Chain Determining Domain
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Linear Ubiquitin chain Assembly Complex

M,N,O

MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEF2B	Myocyte-specific Enhancer Factor 2B
MJD	Machado Joseph Disease Protein Domain Protease
NEMO	NF-κB Essential Modulator
NF-AT	Nuclear Factor for Activated T cell
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NIK	NF-κB Inducible Kinase
NLS	Nuclear Localisation Sequence
OTU	Ovarian Tumor Protease

P,Q,R

PCNSL	Primary Central Nervous System Lymphoma
PEL	Primary Effusion Lymphoma
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phosphlipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMBL	Primary Mediastinal B cell Lymphoma
RHD	Rel Homology Domain
RING	Really Intersting New Gene

S,T,U

SHARPIN	Shank-Associated RH Domain-Interacting Protein
TAD	Transactivation Domain
TCR	T Cell Receptor
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UBA	Ubiquitin Associated Domain
UBAN	Ubiquitin Binding Domain
UBIP	Ubiquitous Immunopoietic Polypeptide
UBL	Ubiquitin Like Domain
UCH	Ubiquitin C-terminal Hydrolase
USP	Ubiquitin Specific Protease

RÉSUMÉ

Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL, Diffuse Large B-Cell Lymphoma) constitue le lymphome non Hodgkinien le plus fréquemment diagnostiqué. Les DLBCL sont composés principalement de deux sous groupes : l'entité nommée ABC (Activated B Cell-like) qui est la plus agressive, avec un taux de survie de 30% après traitement, et l'entité GCB (Germinal-Center B Cell). Contrairement aux GCB DLBCL, les ABC DLBCL se caractérisent par une signature génique similaire aux lymphocytes B activés par leur récepteur antigénique (BCR, B Cell Receptor) à cause de l'accumulation de mutations génétiques. Ceci a pour conséquence une activation constitutive du facteur de transcription NF-κB pour laquelle les lymphomes ABC DLBCL ont développé une profonde addiction. Toutefois, la nature pléiotrope de NF-κB rend son ciblage thérapeutique inenvisageable.

Mon projet de thèse visait à caractériser de nouveaux régulateurs de la voie d'activation du facteur NF-κB par les récepteurs antigéniques en condition physiologique et pathologique.

Dans un premier temps, grâce à un crible protéomique par spectrométrie de masse, nous avons identifié un complexe ternaire nommé LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex) comme un acteur majeur de l'activation de NF-κB par le TCR et le BCR, et de la survie des lymphomes ABC DLBCL. Dans un second temps, le crible d'une librairie de mille deux cents molécules chimiques nous a permis d'isoler un composé sélectivement toxique *in vitro* pour les lymphomes ABC DLBCL. Nous montrons que ce composé entraine la mort apoptotique des ABC DLBCL sans toutefois affecter la signalisation NF-κB. Un tel composé pourrait, dans le futur, être utilisé comme une nouvelle molécule thérapeutique pour le traitement du lymphome ABC DLBCL.

.

INTRODUCTION

I) Activation du facteur de transcription NF-κB par les récepteurs antigéniques

I.1) NF-κB : 29 ans d'histoire

I.1.A) Description du facteur de transcription NF-κB

NF-κB : un facteur de transcription ubiquitaire

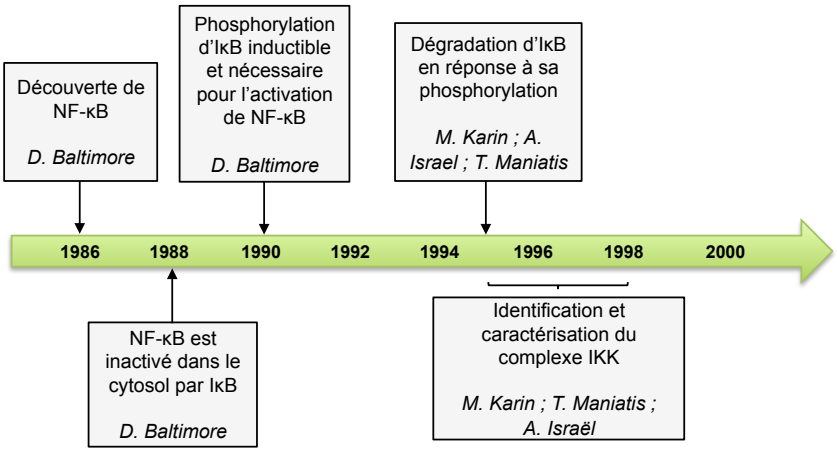
En 1986, les équipes de Phillip Sharp et David Baltimore mettent pour la première fois en évidence que des facteurs nucléaires issus de lymphomes B humains peuvent lier les régions régulatrices de la transcription des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines [1]. Cette même année, en étudiant plus précisément les sites régulateurs de l'expression des chaînes κ des immunoglobulines, l'équipe de David Baltimore montrera qu'une séquence particulière (5'-GGGACTTTCC-3') peut être liée par un facteur nucléaire issus de lignées de cellules B matures humaines et murines. Ce facteur sera ainsi nommé NF-κB pour "Nuclear Factor-κB" [2]. Il sera secondairement établi que NF-κB se fixe en réalité sur une séquence d'ADN consensus 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' où N correspond à n'importe quel acide nucléique, Pu correspond à une purine et Py à une pyrimidine [3, 4].

Bien que l'expression de NF-κB fut initialement supposée être restreinte aux lymphocytes B, l'absence apparente du complexe NF-κB/ADN dans les cellules pré-B 70Z/3 exprimant des immunoglobulines suggère un modèle plus complexe [2]. De manière intéressante, il apparaît que la liaison de NF-κB à l'ADN est inductible par le lipopolysaccharide (LPS) ou le phorbol ester dans les lignées de cellules pré-B humaines et murines ainsi que dans une lignée de lymphocyte T humain (Jurkat) et une lignée non lymphoïde (HeLa) [5]. NF-κB est donc un facteur de transcription ubiquitaire et inductible.

Il sera par la suite établi que NF-κB est séquestré dans le cytoplasme des cellules pré-B et HeLa en l'absence de stimuli par une famille d'inhibiteurs nommée IκB pour "Inhibitor of NF-κB" [6-8]. Dès 1990, Baltimore et collègues établissent que la phosphorylation du

membre IκBα en réponse au phorbol ester lève son rôle inhibiteur [9]. Cinq ans plus tard, et quasiment simultanément, les équipes de Michael Karin, Alain Israel et Tom Maniatis mettront en évidence que cette modification post-transcriptionelle engendre l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome d'IκBα, permettant ainsi la translocation nucléaire de NF-κB [10-12]. Un complexe kinase compris entre 700 et 900 kDa sera rapidement identifié comme responsable de la phosphorylation d'IκBα dans des cellules HeLa traitées par du TNFα [13, 14]. Ce complexe, dont la composition exacte demeure largement méconnue, sera ainsi nommé IKK pour "Inhibitor of NF-κB Kinase".

Depuis 1986, NF-κB constitue un intense sujet de recherche et plus de 40 000 publications lui sont associées. A l'heure actuelle, plus de 500 gènes cibles de NF-κB ont d'ailleurs été identifiés (http://www.nf-kb.org). Nous allons dans cette partie détailler tout le processus d'activation de NF-κB.

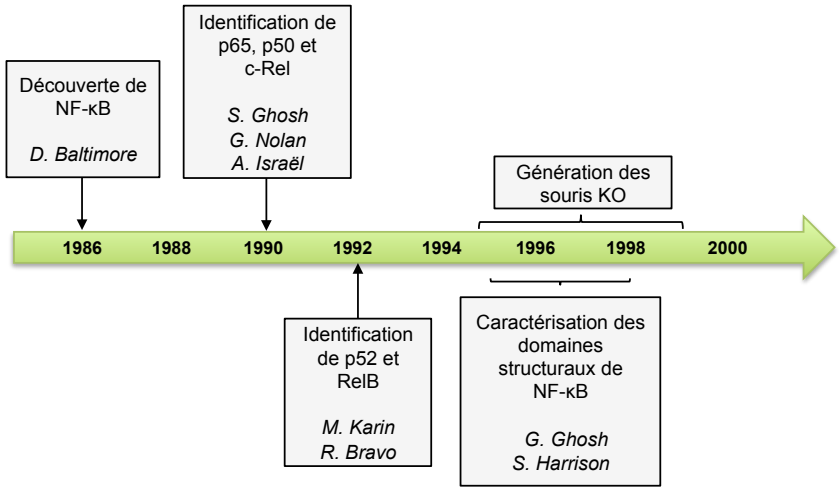


Frise chronologique : Découverte de NF-κB

La famille Rel

Le terme NF-κB rassemble un ensemble d'homo- et d'hétéro-dimères appartenant à la famille Rel. De 1990 à 1992, 5 membres de la famille Rel seront identifiés : p65 (aussi appelé RelA), RelB, c-Rel, et enfin p52 et p50 qui proviennent du clivage de leurs précurseurs respectifs p100 et p105 [15-20] (Fig.1). Ainsi, les cinq membres de la famille Rel peuvent former 15 dimères différents (Fig.2). Si l'hétérodimère p65/p50 est le plus fréquemment retrouvé et est commun à de multiple types cellulaires, les dimères p65/p65, p65/c-Rel, p65/p52, c-Rel/c-Rel, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p50/p50, RelB/p50 et RelB/p52 ne sont décrits que dans quelques types cellulaires (tableau 1).

De 1995 à 1998, des données cristallographiques ont montré que les protéines de la famille Rel se caractérisent par la présence d'un domaine NH_2-terminal de 300 acides aminés nommé RHD ("Rel Homology Domain"). Ce domaine est essentiel pour la dimérisation des différents membres de la famille Rel ainsi que pour leur liaison à l'ADN. Ces études montrent de surcroit que le domaine RHD contient une séquence NLS ("Nuclear Localisation Sequence") indispensable pour la localisation nucléaire de NF-κB [21-23].



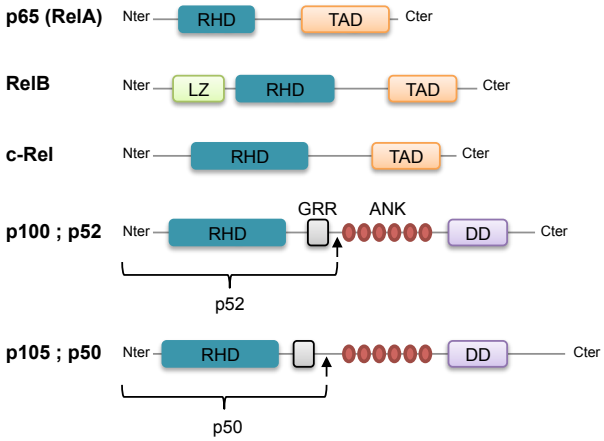
Frise chronologique : Caractérisation de la famille Rel

Les différents facteurs de transcription NF-κB

❖ Les données de structure

Les différents NF-κB peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur activité transcriptionnelle. En effet, seuls p65, c-Rel et RelB possèdent un domaine COOH-terminal de transactivation (TAD : "Transactivation Domain") nécessaire pour induire la transcription [24, 25] (Fig.1). Ainsi, uniquement 9 des 15 dimères ont une activité transcriptionnelle. Les trois homo- et hétéro-dimères formés à partir de p50 et p52 ne possèdent pas de domaine TAD et sont des répresseurs de la transcription [26]. Les dimères p65/RelB, c-Rel/RelB et RelB/RelB ne peuvent pas lier l'ADN et sont donc transcriptionnellement inactifs (Fig.2).

RelB fait figure à part parmi les membres de la famille Rel car il ne peut former des dimères qu'avec p50 et p52 [19, 27]. De plus, RelB est le seul membre qui possède un domaine leucine zipper indispensable pour son activité transcriptionnelle [28].



ANK: motifs ankyrin ; **DD:** Death Domain ; **GRR:** Glycine-Rich Region ; **HLH:** Helix–Loop–Helix ; **LZ:** Leucine-Zipper; **RHD:** REL Homology Domain ; **TAD:** Transactivation Domain;
➔ site de clivage

FIGURE 1 : *Représentation schématique des membres de la famille Rel*

Cinq membres composent la famille Rel : p65, RelB, c-Rel, ainsi que les précurseurs de p52 et p50 : p100 et p105 respectivement. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine RHD qui contient la séquence de localisation nucléaire de NF-κB (NLS).

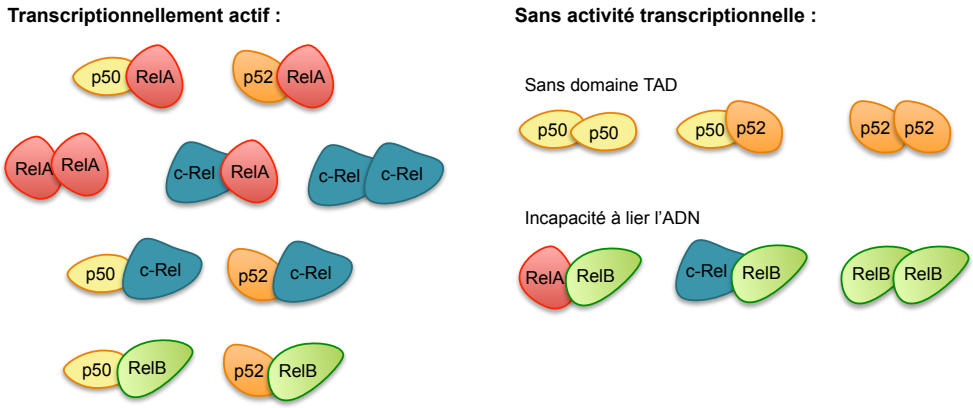


FIGURE 2 : *Les différents NF-κB*

Les cinq membres de la famille Rel p65, RelB, c-Rel, p52 et p50 peuvent former 15 facteurs de transcription NF-κB différents par homo- et hétéro-dimérisation. Neuf dimères possèdent une activité transcriptionnelle. Les six autres sont inactifs : les dimères p50/p50, p50/p52 et p52/p52 n'ont pas de domaine TAD nécessaire à l'activité transcriptionnelle, et les dimères RelA/RelB, c-Rel/RelB et RelB/RelB n'ont pas la capacité de se lier à l'ADN.

❖ Les souris knockout

Si des données structurales ont pu discriminer les différents NF-κB en fonction de leur capacité à induire la transcription, l'invalidation chez la souris des différents gènes codant les membres de la famille Rel donne un aperçu de la fonction de chacun d'entre eux (tableau 1). En outre, l'invalidation simultanée de deux ou trois membres Rel illustre la redondance des différentes protéines de cette famille. En effet, ces souris arborent des phénotypes accentués par rapport aux simples knockout, ainsi que des défauts supplémentaires tels que l'absence de dents, l'absence de lymphocytes B, des retards de croissance... Quelques exemples sont recensés dans le tableau 2. Dans l'ensemble, ces données mettent en évidence le rôle central de NF-κB pour la mise en place du système immunitaire, le développement et la différentiation de certains organes [29, 30].

Tableau 1 : *Phénotype des souris knockout pour les gènes codant la famille Rel*

gène	expression	knockout	
		létalité	caractéristiques
nfκb1 **(p105)**	ubiquitaire	aucune	- défaut de mise en place d'une réponse immunitaire humorale suite à la reconnaissance antigénique - défaut de prolifération des lymphocytes B en réponse au LPS et au CD40L - lymphocytes B sensibles à l'apoptose en réponse au LPS
nfκb2 **(p100)**	- épithélium de l'estomac - medulla du thymus - périphérie de la rate - macrophage - cellules dendritiques - lymphocytes T et B	aucune	- défaut d'architecture de la rate et des ganglions lymphatiques - défaut d'activation des récepteurs antigéniques / défaut de présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigène - absence de centre germinal
crel	- lymphocyte - monocyte - granulocyte - érythrocyte	aucune	- lymphocytes T et B : défaut d'activation, de prolifération et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires - défaut de recombinaison isotypique
rela	ubiquitaire	stade embryonnaire E15	- apoptose massive des hépathocytes due à une grande sensibilité au TNFα
relb	- dendritique - lymphocyte	50% de mortalité à 3 mois	- défauts multiples d'activation du système immunitaire - inflammation multiple - hyperplasie myéloïde - splénomégalie - défaut d'activation des récepteurs antigéniques - défaut de prolifération des lymphocytes B

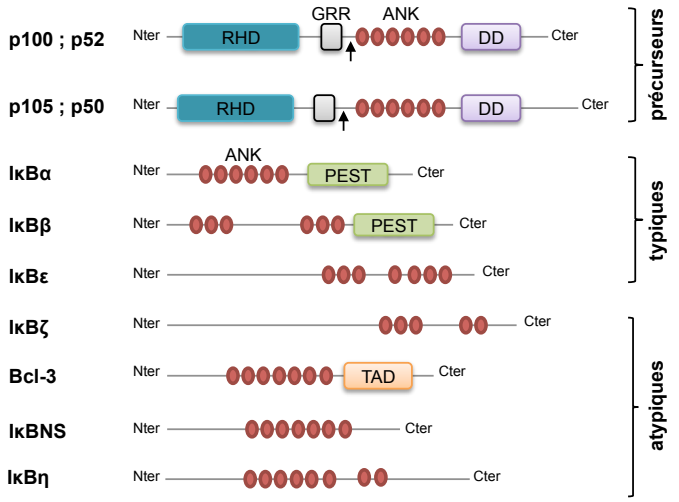
Tableau 2 : *Phénotype des souris knockout pour deux ou trois gènes codant la famille Rel*

génotype	létalité	caractéristiques
nfκb1 $^{-/-}$ ***nfκb2*** $^{-/-}$	mort au sevrage car absence de dents	- phénotype des simples KO accentué - retard de croissance - ostéoporose - défaut de maturation des cellules B
nfκb1 $^{-/-}$ ***relb*** $^{-/-}$	mort 3 à 4 semaines après la naissance	- phénotype des simples KO accentué - absence de lymphocytes B
nfκb1 $^{-/-}$ ***crel*** $^{-/-}$	aucune	- phénotype des simples KO accentué - absence de centre germinatif - défaut de maturation des cellules dendritiques
nfκb1 $^{-/-}$ ***nfκb2*** $^{-/-}$ ***relb*** $^{-/-}$	mort périnatale	- phénotype des simples KO accentué - inflammation des organes très sévère

I.1.B) Les inhibiteurs de NF-κB : la famille des IκBs

Caractéristiques des IκBs

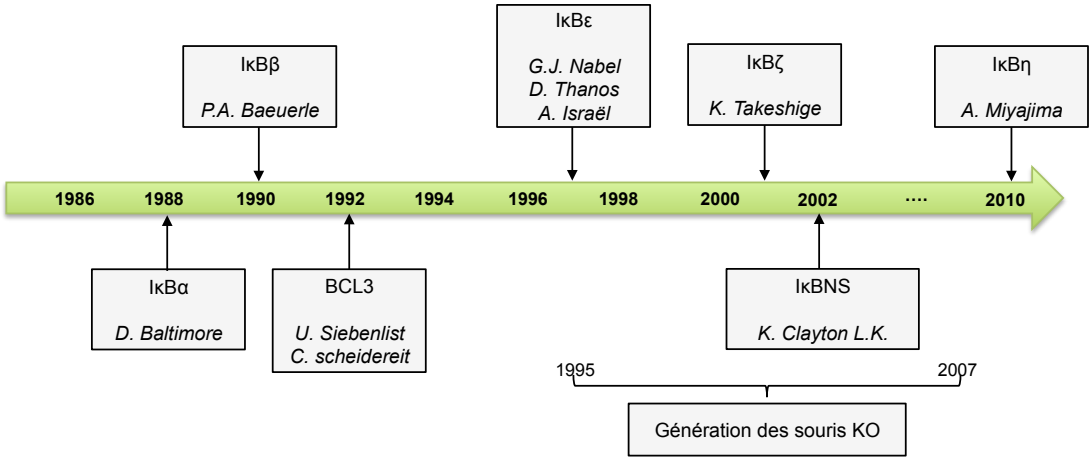
"Inhibitor of NF-κB" ou IκB est responsable de la rétention de NF-κB dans le cytoplasme des cellules à l'état basal [6-8]. IκB est un terme générique qui fait référence à une famille de 9 protéines. Elle est formée de trois membres dit « typiques » : IκBα [8], IκBβ [31], et IκBε [32-34]; de quatre membres dit « atypiques » : IκBζ [35], BCL3 [36-38], IκBNS [39] et IκBη [40]; ainsi que des précurseurs de NF-κB p100 et p105 qui jouent également le rôle d'inhibiteur de NF-κB [33, 40-43] (Fig.3). Tous ces membres arborent cinq à huit motifs ankyrin de 33 acides aminés qui assurent une interaction avec le domaine RHD de NF-κB [44]. En masquant la séquence NLS de NF-κB, les IκBs le retiennent dans le cytoplasme et l'empêchent d'exercer sa fonction de facteur de transcription [45, 46]. La génération de souris knockout pour les différents IκBs suggère une grande diversité de fonction entre les différents membres (tableau 3 ; adapté de *Hinz, M. et al, Immunol rev, 2012*) [47].



ANK: motifs ankyrin ; **BCL-3:** B-Cell Lymphoma 3 ; **DD:** Death Domain ; **GRR:** Glycine-Rich Region ; **PEST:** proline-, glutamic acid-, serine- and threonine-rich region ; **RHD:** REL Homology Domain → site de clivage

FIGURE 3 : *Représentation schématique des membres de la famille des IκBs*

La famille IκB est caractérisée par la présence de cinq à sept motifs ankyrin (ANK). Elle est composée de trois membres typiques IκBα, IκBβ et IκBε, de quatre membres atypiques IκBζ, IκBNS, IκBη et Bcl-3, ainsi que des précurseurs de p52 et p50 : p100 et p105.



Frise chronologique : Caractérisation de la famille IκB

Les IκBs typiques

❖ Présentation des IκBs typiques

Les IκBs dits typiques, IκBα, IκBβ, et IκBε ne peuvent interagir qu'avec certains membres NF-κB. Ainsi, IκBα et IκBβ s'associent préférentiellement aux hétéro-dimères p50 et p52 complexés à c-Rel et p65 alors qu'IκBε s'associe uniquement aux homo- et hétéro-dimères formés à partir de p65 et c-Rel [45, 48].

Les IκBs typiques sont caractérisés par la présence d'une séquence consensus NH_2-terminale DSGXXS (où D est un acide aspartique, S une sérine, G une glycine et X n'importe quel acide aminé). En réponse à des stimuli, les IκBs typiques vont être dégradés suite à la phosphorylation des deux résidus sérine de cette séquence. Ainsi la séquence nucléaire de NF-κB sera démasquée et le facteur de transcription pourra transloquer dans le noyau [49, 50]. Il faut noter que NF-κB induit entre autre la transcription des gènes codant pour les IκBs typiques, permettant ainsi leur synthèse et un retour à l'état basal [51].

❖ IκBα

Le complexe IκBα/p50/p65 est le complexe le plus fréquemment retrouvé dans les lymphocytes et donc l'un des plus étudiés. Il diffère des différents complexes IκB/NF-κB dans la mesure où IκBα masque la séquence de localisation nucléaire (NLS) de p65 alors que celle de p50 reste accessible. Par conséquence, le complexe IκBα/p50/p65 fait des va-et-vient entre le noyau et le cytosol à l'état basal. Par contre, la dégradation d'IκBα va démasquer la séquence NLS de p65 permettant la translocation nucléaire et l'activation du complexe p50/p65 [52, 53].

❖ IκBβ

Deux isoformes d'IκBβ sont exprimées dans les cellules humaines : IκBβ1 et IκBβ2. Si IκBβ2 est strictement cytosolique, IκBβ1 peut être nucléaire lorsqu'il n'est pas phosphorylé. IκBβ1 est notamment localisé dans le noyau des lymphocytes B en l'absence de stimulation [54]. En plus de leur localisation sub-cellulaire, ces deux isoformes diffèrent par leur cinétique de dégradation en réponse aux stimuli activant NF-κB. Tandis qu'IκBβ1 est très rapidement éliminé, IκBβ2 est dégradé lentement et

partiellement. Deux articles ont mis en lumière le rôle d'IκBβ1 dans le noyau. Ces études suggèrent qu'IκBβ1 facilite le recrutement du complexe p65/c-Rel au niveau de certains promoteurs cibles de NF-κB permettant ainsi une expression prolongée de gènes comme le TNFα ou l'interleukine-1β en réponse au LPS [55, 56].

- ❖ IκBε

IκBε est l'IκB typique le moins étudié et le moins bien caractérisé. IκBε est dégradé plus lentement qu'IκBα [33]. De plus, IκBε fait aussi des va-et-vient entre le noyau et le cytosol mais de façon moins efficace qu'IκBα [57].

Les IκBs atypiques

Initialement, les IκBs sont décrits comme des simples inhibiteurs de NF-κB mais la découverte des IκBs atypiques suggèrera en réalité un modèle bien plus complexe. Ainsi, IκBζ, BCL3, IκBNS et IκBη sont préférentiellement localisés dans le noyau où ils inhiberaient la liaison de NF-κB à l'ADN. Cependant ils arborent également une grande diversité d'autres fonctions détaillées dans le tableau 3 [47].

Les précurseurs de NF-κB

Les précurseurs de NF-κB p100 et p105 jouent également le rôle d'inhibiteur de NF-κB en le séquestrant dans le cytosol de la même façon que les IκBs typiques [41, 58, 59]. En réponse à des stimuli qui activent NF-κB ils sont phosphorylés puis clivés pour donner les formes actives de NF-κB p52 et p50 [60, 61]. Cependant, tout comme les IκBs typiques, p105 peut aussi subir une dégradation complète en réponse au stimulus [62]. L'expression des gènes codant pour p100 et p105 est contrôlée par NF-κB lui même, ce qui permet une resynthèse des précurseurs p100 et p105 après l'activation du facteur de transcription et un retour à l'état basal [63, 64]. De manière intéressante, alors que p105 a la capacité de se complexer avec tous les monomères et dimères formés à partir de p50, p52, p65 et c-Rel, p100 lui est le seul IκB pouvant se lier à RelB (tableau 3).

Tableau 3 : *Fonction des IκBs*

protéine	NF-κB lié	phénotype des souris knockout
IκBα	tous les hétérodimères	- létal environ 7 jours après la naissance - inflammation de la peau - activation de NF-κB persistante après traitement avec du TNFα ou du LPS
IκBβ	tous les hétérodimères	- aucune létalité - résistante au choc septique induit par l'action du LPS - expression prolongées de cytokines pro-inflammatoires lors de la réponse immunitaire
IκBε	tous les hétérodimères	- aucune létalité - expression prolongée de cytokines pro-inflammatoires et de certaines immunoglobulines lors de la réponse immunitaire
IκBζ	p50/p50	- aucune létalité - inflammation de la peau - défaut de réponse à la stimulation des TLRs ou à l'IL1
BCL3	p50/p50 p52/p52	- aucune létalité - défaut de développement de la rate - défaut de différentiation des lymphocytes T - réponse humorale défaillante
IκBNS	p50/p50	- aucune létalité - grande sensibilité au LPS ; inflammation de l'intestin - défaut de prolifération des lymphocytes T - défaut de production de cytokines
IκBη	p50/p50	pas encore de KO généré
p105	tous les monomères et dimères	- aucune létalité - plusieurs fonction immunitaires défectueuses
p100	RelB	- aucune létalité - défaut de développement des organes lymphoïdes secondaires - défaut de maturation des lymphocytes B

I.1.C) Les différentes voies d'activation de NF-κB

La voie canonique et non canonique

NF-κB joue un rôle essentiel dans la mise en place d'une réponse immunitaire. En réponse à divers stimuli comme des infections virales ou bactériennes, des stress physiques et oxydatifs ainsi que des chocs osmotiques, plusieurs gènes cibles de NF-κB peuvent être induits et vont ainsi permettre l'expression de cytokines, de cyclines, de régulateurs de l'apoptose etc...[24, 65] (Fig.4). On distingue en réalité deux grandes voies d'activation de NF-κB. La stimulation des cellules via les TLRs (Toll Like Receptor), les récepteurs antigéniques, ou par de nombreuses cytokines pro-inflammatoire (TNFα, IL-1β...), induit une activation rapide de NF-κB qui n'implique pas de synthèse protéique : c'est la voie canonique. A contrario, la voie non canonique, qui est spécifique des lymphocytes B, s'enclenche en réponse à certaines cytokines de la famille du TNF ("Tumor Necrosis Factor") comme CD40L, BAFF ou lymphotoxine-β. La voie non canonique engendre une activation lente de NF-κB qui dépend de la synthèse protéique. Dans tous les cas, le complexe kinase IKK a en charge la phosphorylation des IκBs.

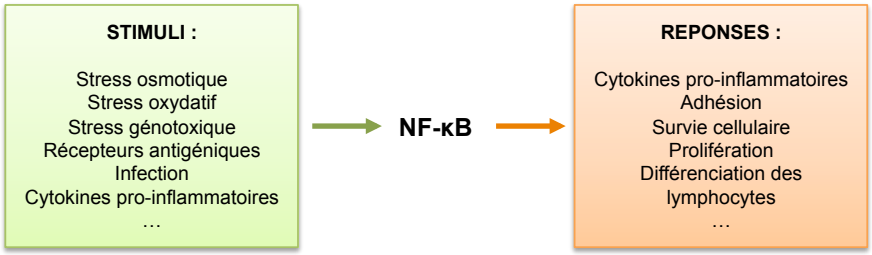


FIGURE 4 : *Rôle central de NF-κB en réponse à divers stimuli*

NF-κB joue un rôle central dans la régulation de la transcription en réponse à une grande variété de stimuli. En réponse à différents stress (génotoxique, osmotique, oxydatif), à la stimulation des récepteurs antigéniques, à des infections (reconnaissance de LPS, ARN double brin) ou à des cytokines pro-inflammatoires, NF-κB va permettre la transcription de gènes cibles spécifiques pour conduire une réponse cellulaire adaptée. NF-κB va notamment pouvoir induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, contrôler la prolifération, l'adhésion, la survie, l'apoptose des cellules ainsi que la différenciation des lymphocytes.

Le complexe IKK

❖ Composition

IKK ou "IκB kinase" est un complexe d'environ 700-900 kDa responsable de la phosphorylation des IκBs. Il est principalement composé de deux sous unités catalytiques IKKα [13] et IKKβ [66] et d'une sous unité régulatrice IKKγ aussi nommée NEMO pour "NF-κB essential modulator" [67, 68] (Fig.5). La composition exacte du complexe IKK demeure encore indéterminée, cependant certains partenaires ont pu être identifiés, comme HSP70 ("Heat Shock Protein 70") qui interagit avec NEMO pour inhiber l'activation de NF-κB [69], HSP90 et sa chaperonne Cdc37 qui stabilisent le complexe IKK [70], ou ELKS qui régule l'activité du complexe IKK [71].

IKKα et IKKβ sont des sérines/thréonines kinases composées de quatre domaines structuraux essentiels : les domaines kinase, leucine zipper et hélice-boucle-hélice sont indispensables pour l'activité catalytique du complexe IKK ; le domaine leucine zipper est aussi requis pour la formation des complexes IKKα/IKKβ et IKKα/IKKα ; et un domaine NBD ("NEMO Binding Domain") nécessaire pour l'interaction de NEMO avec l'hétérodimère IKKα/IKKβ [72, 73].

NEMO contient deux domaines coiled-coil, un domaine leucine zipper et un domaine dit en doigt de zinc ("zinc Finger"). Il comprend également un domaine UBAN ("Ubiquitin Binding Domain") qui chevauche le deuxième domaine coiled-coil et le domain leucine zipper. Des données de cristallographie montrent que NEMO peut s'oligomériser et lier

les homo- et hétéro-dimères formés à partir d'IKKα et IKKβ. L'oligomérisation de NEMO pourrait moduler sa fonction régulatrice [74, 75]. Le domain UBAN joue également un rôle majeur au sein du complexe IKK, car il permet à NEMO de reconnaitre et de lier des chaînes d'ubiquitine et il est indispensable pour l'activation de NF-κB [76-78].

L'ablation d'IKKβ ou de NEMO est létale chez la souris. Toutefois, les études réalisées à partir des fibroblastes embryonnaires (cellules MEF : "Mouse Embryonic Fibroblast") ont révélé le rôle central d'IKKβ et NEMO dans l'activation de NF-κB en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, LPS...) [79, 80]. Des mutations dans le gène codant pour NEMO sont aussi retrouvées chez l'Homme et sont associées à des problèmes de développement et des immunodéficiences, montrant ainsi un rôle clé de NEMO dans la mise en place du système immunitaire [81-83]. Les souris knockout pour IKKα meurent rapidement après la naissance et présentent des défauts très prononcés de développement. A l'inverse d'IKKβ et NEMO, l'activation de NF-κB en réponse à certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα n'est que faiblement compromise dans les cellules MEF *ikkα*$^{-/-}$ [84]. Ainsi, la fonction d'IKKα dans la voie canonique reste encore mal caractérisée.

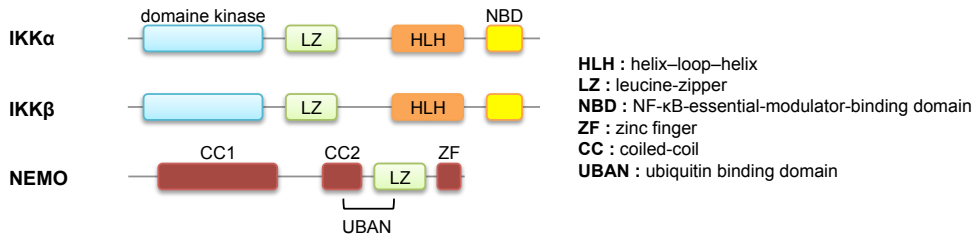


FIGURE 5 : *Composition du complexe IKK*

Le complexe IKK (Inhibitor of NF-κB Kinase) est composé deux sous unités catalytiques (IKKα et KKβ) et d'une sous unité régulatrice (IKKγ, NEMO)

❖ KK et la voie canonique

La stimulation de la voie canonique repose sur la mise en place de larges signalosomes qui servent de plateforme pour le recrutement et l'activation du complexe IKK. La composition de ces complexes activateurs d'IKK varie selon la nature du stimulus employé, même si le complexe kinase TAK1/TAB1/TAB2 en charge la phosphorylation d'IKKβ est présent dans chacun d'entres eux [85, 86]. Les processus d'ubiquitination jouent ici un rôle central pour le recrutement et l'activation du complexe IKK (Fig.6A ; chapitre II.2).

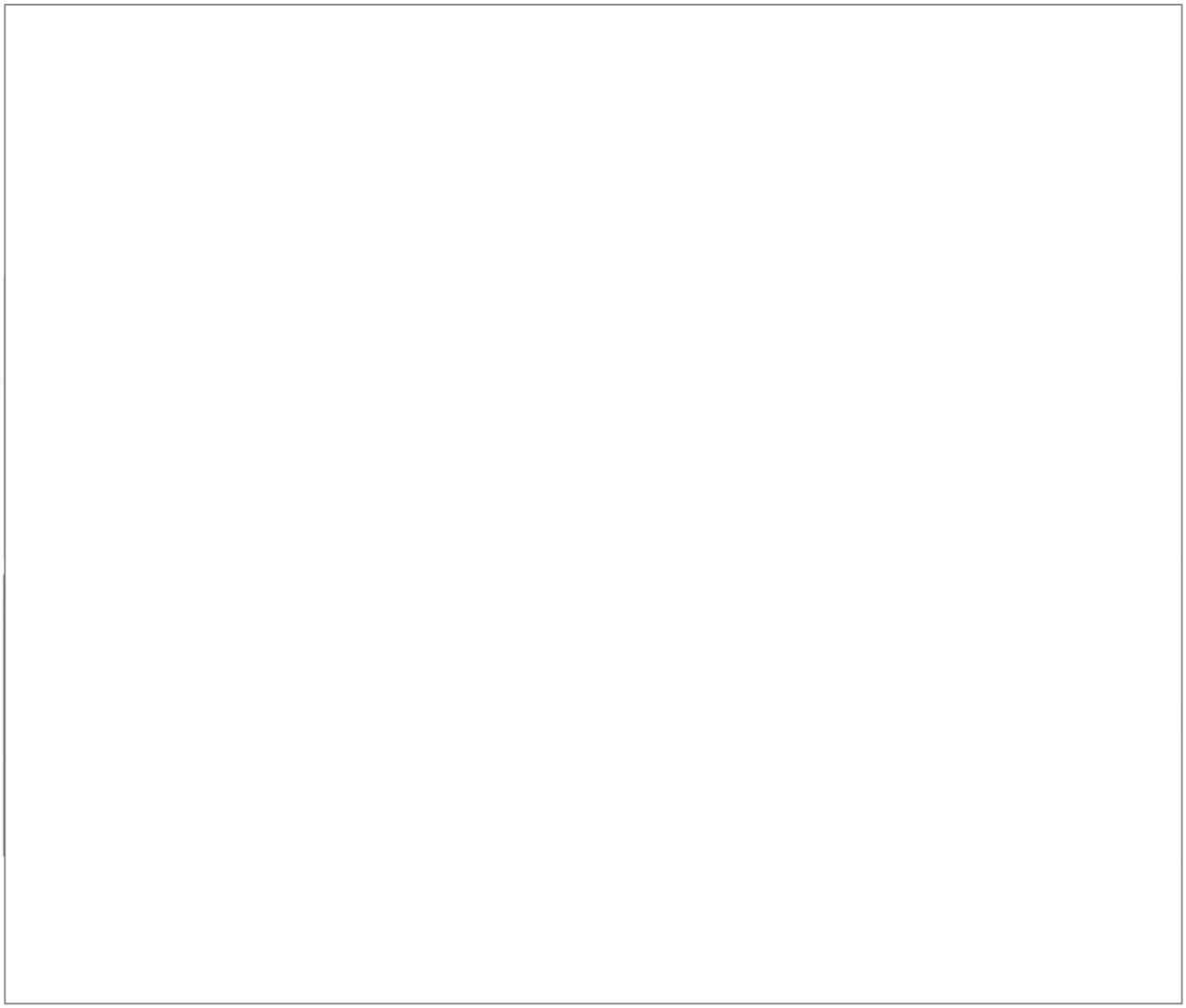


FIGURE 6 : *Voie canonique d'activation de NF-κB*

Figure issue de *Schmukle AC et al., 2012* (Ref 340)

La voie canonique permet une activation rapide de NF-κB en réponse à une grande variété de stimuli. Dans ce cas, le complexe kinase IKK (formé de deux sous unités catalytiques IKKα et IKKβ, et d'une sous unité régulatrice NEMO) est activé par le complexe activateur d'IKK dont la composition varie en fonction du stimuli. L'activation d'IKK se traduit par la phosphorylation d'IKKβ et l'ubiquitination non dégradative de NEMO. En retour, IKK phosphoryle l'inhibiteur de NF-κB. Ce dernier est alors ubiquitinilé puis dégradé par le protéasome. Ainsi la séquence NLS de NF-κB est démasquée et ce dernier peut se transloquer dans le noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles.

❖ IKK et la voie non canonique

La voie non canonique met en jeu un complexe kinase IKK composé de deux sous-unités IKKα. Ici, c'est la kinase NIK (NF-κB Inducible Kinase) qui assure la phosphorylation d'IKKα [87]. A l'état basal NIK est constitutivement dégradé. En revanche, certains stimuli stabilisent NIK qui peut alors phosphoryler IKKα [88]. Ainsi activé, IKK phosphoryle à son tour le précurseur de NF-κB p100 qui est alors clivé par le

protéasome pour donner la forme mature de NF-κB p52 [89, 90]. Complexé à RelB, le dimère p52/RelB se transloque alors dans le noyau (Fig.7).

FIGURE 7 : *Voie non canonique d'activation de NF-κB*

Figure issue de *Schmukle AC et al., 2012* (Ref 340)

La voie non canonique permet une activation lente de NF-κB en réponse à la stimulation des récepteurs de la famille des TNFR (TNF receptor). La kinase NIK (NF-κB inducible kinase) est constitutivement dégradée à l'état basal. En réponse à certains stimuli, NIK est stabilisé et phosphoryle le complexe IKK formé de deux sous-unités IKKα. Le précurseur p100 complexé à RelB, est alors phosphorylé par IKK puis ubiquitinilé et clivé par le protéasome pour donner la forme mature p52. Ainsi, le dimère RelB/p52 peut transloquer dans le noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles.

I.2) Activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques

I.2.A) Importance des récepteurs antigéniques et immunité adaptative

Activation des récepteurs antigéniques

Au cours de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (TCR : "T Cell Receptor") et des lymphocytes B (BCR : "B Cell Receptor") sont activés par la reconnaissance d'antigènes complexés au CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) des cellules présentatrices d'antigènes (APC : Antigen-Presenting Cell). Plusieurs voies complexes de signalisation sont alors mises en place pour permettre la différenciation, la prolifération et la survie des lymphocytes [29]. Par exemple, la stimulation des récepteurs antigéniques conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 via les MAP kinases [91]. En parallèle, la phospholipase Cγ (PLCγ) hydrolyse le lipide membranaire phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) [92]. L'IP3 induit un efflux de calcium (Ca^{2+}) impliqué dans l'activation du facteur de transcription NF-AT [93], tandis que l'activation de la protéine kinase PKC par le calcium et le DAG aboutit à l'activation de NF-κB et des intégrines [94] (Fig.8).

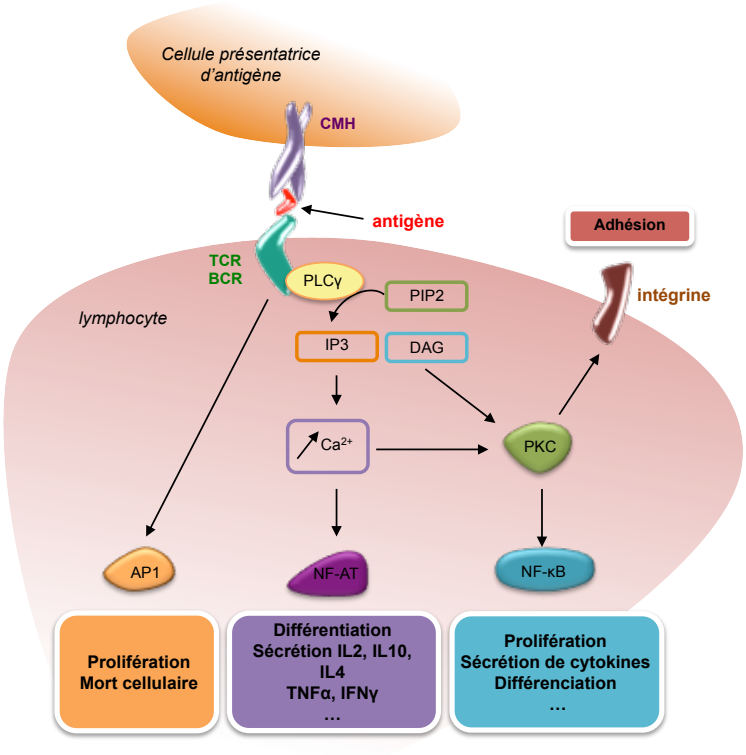


FIGURE 8 : *Récepteurs antigéniques et réponse immunitaire adaptative*

Les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR) sont activés par la reconnaissance d'un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène. Le facteur de transcription AP-1 composé de c-jun et c-fos transloque alors dans le noyau. En parallèle la phospholypase Cγ (PLCγ) associée aux récepteurs antigéniques hydrolyse le lipide membranaire PIP2 (phosphatydilinositol diphosphate) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 va induire un efflux de calcium provenant du réticulum endoplasmique et permettant l'activation d'un deuxième facteur de transcription : NF-AT. Enfin, l'efflux de calcium et le DAG vont permettre l'activation de la protéine kinase C (PKC) et aboutir à l'activation du facteur de transcription NF-κB et des intégrines. Ainsi, l'activation des récepteurs antigéniques va permettre la prolifération, la différenciation des lymphocytes et la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires.

Structure des récepteurs antigéniques

Le récepteur antigénique des lymphocytes T est un récepteur transmembranaire formé de deux chaînes polypetidiques α,β, ainsi que du cluster de différenciation CD3 [95]. Le récepteur antigénique des lymphocytes B est lui constitué des immunoglobulines IgH et IgL associées aux clusters de différenciation CD79A et CD79B [96]. Alors que les chaînes α et β du TCR ainsi que les immunoglobulines du BCR assurent la reconnaissance antigénique, les clusters de différenciation CD3 ainsi que CD79A et CD79B sont cruciaux pour propager le signale d'activation. En effet, suite à l'activation des récepteurs antigéniques, les motifs ITAM ("Immunomoreceptor Tyrosine-based Activation Motif") situés dans la partie cytosolique des clusters de différenciation sont phosphorylés par des kinases de la famille SRC. SYK ainsi que d'autres kinases sont alors recrutées et se concentrent à la membrane plasmique au niveau de ces motifs. C'est à cet endroit que va avoir lieu le clivage du lipide membranaire PIP2 en deux effecteurs cytosoliques IP3 et DAG par la phospholipase C [97]. Le tableau 4 recense quelques différences entre les lymphocytes T et les lymphocytes B.

Tableau 4 : *Exemples de quelques effecteurs spécifiques des lymphocytes T et des lymphocytes B*

type de protéine	Lymphocytes T	Lymphocytes B
SRC kinase	Fyn, LcK	Lyn, Fyn, BLK
autre kinase	ZAP70	BTK
Phospholipase	PLCγ1	PLCγ2
PKC	PKCθ	PKCβ

I.2.B) Dissection de la voie d'activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques

Détail de la voie de signalisation

La reconnaissance antigénique par le TCR et le BCR met en jeu une voie de signalisation complexe qui culmine avec l'activation de NF-κB. Ainsi, l'engagement des récepteurs antigéniques active rapidement de nombreuses kinases dont la protéine kinase C théta ou béta (PKCθ dans les lymphocytes T [98] ; PKCβ dans les lymphocytes B [99]). Ces kinases phosphorylent en retour la protéine d'échafaudage CARMA1 sur plusieurs résidus sérine pour permettre sa redistribution et son activation au niveau de raft lipidiques [100]. CARMA1 recrute alors l'hétérodimère BCL10/MALT1 dans un signalosome appelé complexe CBM [101, 102]. Au cœur du CBM, BCL10 et MALT1 subissent des ubiquitinations de type non-dégradatives, engageant la lysine 63 de l'ubiquitine (voir chapitre II) [103, 104]. Ces modifications post-traductionnelles autorisent le recrutement et l'activation du complexe IKK qui consiste en la phosphorylation de la sous-unité catalytique IKKβ conjuguée à l'ubiquitination K63 de la sous unité régulatrice (NEMO) [105, 106]. IKK phosphoryle alors l'inhibiteur de NF-κB (IκB) dans le cytosol autorisant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome [49]. Libre, NF-κB se transloque dans le noyau où il se fixe sur les

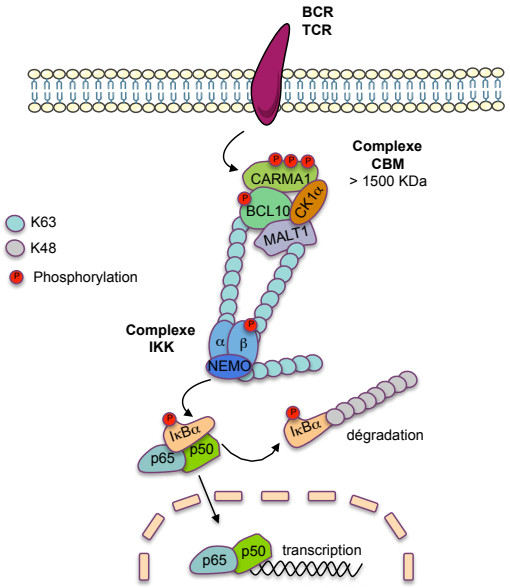


FIGURE 9 : *Activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques*

L'activation des récepteurs antigéniques conduit à la formation du complexe CBM composé de CARMA1, BCL10 et MALT1. Le complexe CBM s'associe à de nombreux partenaires, dont CK1α.
Au sein du CBM, BCL10 et MALT1 subissent des ubiquitinations non dégradatives autorisant le recrutement du complexe IKK au complexe CBM et son activation par la phosphorylation d'IKKβ et l'ubiquitination de NEMO. Ainsi activé, IKK phosphoryle IκBα qui est ensuite ubiquitinilé et dégradé par le protéasome. Ainsi libre, NF-κB transloque dans le noyau et initie la transcription de gènes cibles.

promoteurs de ces gènes cibles impliqués dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative (Fig.9). L'activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques est finement régulée par de nombreux acteurs que nous détaillerons plus tard.

Le complexe CBM

Le cœur du complexe CBM est formé des protéines CARMA1, BCL10, et MALT1 (Fig.10) :

- CARMA1 (CARD-containing MAGUK protein 1)

CARMA1 appartient à la famille des MAGUK qui regroupe des protéines d'échafaudage associées à la membrane plasmique. CARMA1 arbore ainsi un domaine PDZ qui permet des interactions avec des protéines transmembranaires suivi de domaines SH3 et GUK qui assurent des liaisons intramoléculaires [100]. CARMA1 possède également une région coiled-coil nécessaire pour son interaction avec MALT1 et un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) qui permet son association homotypique avec le CARD de BCL10 [107]. Les domaines coiled-coil et PDZ sont séparés par une région de 232 acides aminées riches en sérines appelée "linker" [99]. La stimulation antigénique entraîne la phosphorylation de CARMA1 sur les résidus sérines S552, S564 et S657 par la PKCθ ou PKCβ, sur la sérine S608 par la kinase CK1α et sur la sérine S578 par IKKβ [98, 99, 108, 109]. Fait intéressant, la substitution des résidus sérines S564 et S657 en alanine dans des lignées de lymphocytes T (Jurkat) et de lymphocytes B (DT40) inhibe l'activation de NF-κB en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques alors que la délétion du domaine linker induit une activation constitutive de NF-κB [99]. Le modèle actuel propose que CARMA1 soit maintenu dans une conformation inactive par des interactions intramoléculaires entre les domaines SH3 et GUK à l'état basal. Cette conformation fermée maintiendrait ainsi le domaine CARD inaccessible. Les phosphorylations des résidus sérines de la région linker de CARMA1 permettraient de rompre ces interactions intramoléculaires et d'exposer le domaine CARD, facilitant ainsi les interactions avec BCL10 et MALT1.

De nombreuses études ont permis de placer CARMA1 en amont de BCL10 dans le complexe CBM, et donc de NF-κB. Par exemple, la surexpression de CARMA1 dans des cellules HEK293T induit la phosphorylation de BCL10 et l'activation de NF-κB [101].

De plus, CARMA1 est nécessaire pour le recrutement de BCL10 au niveau des rafts lipidiques après activation du TCR [100, 110]. Enfin, une mutation dans le domaine CARD de CARMA1 abolit la formation du complexe CBM et l'activation du complexe IKK en réponse à la stimulation du TCR [100]. D'un point de vue physiologique, les lymphocytes issus des souris knockout pour CARMA1 présentent des défauts de prolifération, d'activation de NF-κB et de JNK suite à la stimulation des récepteurs antigéniques. Le développement des lymphocytes B1 et des cellules NK en réponse au LPS, au CD40, aux anti-IgM et suite à la stimulation du BCR sont également compromis chez ces souris, suggérant un rôle central de CARMA1 lors de la mise en place d'une réponse immunitaire [110, 111].

- ❖ BCL10 (B-Cell Lymphoma/Leukemia 10)

BCL10 a été identifié pour la première fois dans des cellules issues d'une forme agressive d'un lymphome B : le lymphome MALT. En effet, la translocation chromosomique t(1;14)(p22;q32) associée à l'agressivité du lymphome MALT1 est à l'origine d'une protéine chimérique constituée de BCL10 et d'une chaîne lourde d'immunoglobuline [112, 113]. BCL10 ainsi surexprimée active constitutivement NF-κB [114]. BCL10 exerce un rôle central dans le complexe CBM. Son domaine CARD lui permet à la fois d'interagir avec le CARD de CARMA1 et avec les deux domaines homologues aux immunoglobulines (immunoglobulin like domain) de MALT1. D'ailleurs, BCL10 et MALT1 forment un dimère constitutif, bien qu'il existe un pool de BCL10 libre.

La génération de souris knockout a mis en évidence l'importance de BCL10 dans le développement du système nerveux central et des organes lymphoïdes. Un embryon sur trois est d'ailleurs létal car certains organes du système nerveux ne sont pas suffisamment développés. Les souris knockout confirment le rôle clé de BCL10 dans la mise en place d'une réponse immunitaire. En effet les lymphocytes T et B présentent des défauts d'activation de NF-κB, de prolifération et de sécrétion de cytokines en réponse à la stimulation des récepteurs antigéniques et la réponse antivirale est également compromise [115, 116].

Les modifications post-traductionnelles et le devenir de BCL10 au sein du complexe CBM restent à ce jour controversés. Pour certains, l'activation des récepteurs

antigéniques entraîne la phosphorylation, l'ubiquitination, puis la dégradation de BCL10 dans le noyau par le protéasome [117]. Pour d'autres, BCL10 subit une dégradation lysosomale indépendante du protéasome [118, 119]. Enfin, un troisième groupe propose que BCL10 soit sujet à une ubiquitination non dégradative permettant le recrutement du complexe IKK au niveau du complexe CBM [104]. Dans cette optique, USP9X a été proposé être une déubiquitinylase de BCL10, indispensable pour la formation correcte du complexe CBM et l'activation de NF-κB [120]. Toutefois, le rôle de USP9X a été récemment remis en cause dans un modèle de lymphocytes T issus des souris knockout pour USP9X [121].

Par ailleurs, BCL10 subit une phosphorylation sur son résidu sérine S138 en réponse à l'engagement du TCR, mais également suite à la stimulation du récepteur Fc des macrophages [122]. Le couple IKKβ/Calcineurine pourrait gouverner cette phosphorylation et ainsi permettre la dissociation de BCL10 et MALT1 et l'abrogation de l'activation de NF-κB [123, 124]. Toutefois, d'autres données suggèrent que la phosphorylation de BCL10 n'influence pas l'activation de NF-κB mais régule l'adhésion des lymphocytes T et des macrophages [122]. D'ailleurs, le clivage de BCL10 par MALT1 promeut l'adhésion cellulaire via l'activation des intégrines [125]. Enfin, BCL10 participe au processus de phagocytose suite à la stimulation du récepteur Fc des macrophages [126].

- MALT1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1)

Tout comme BCL10, la protéine MALT1 a été identifiée comme un marqueur associé à l'agressivité du lymphome MALT. La translocation chromosomique t(11;18)(q21;q21) entraîne la fusion de MALT1 avec la protéine anti-apoptotique cIAP2. Ceci conduit à la surexpression de MALT1 et à l'activation constitutive de NF-κB [114]. MALT1 possède trois domaines homologues aux immunoglobulines (immunoglobulin like domain) qui permettent des interactions avec les domaines CARD de BCL10 et CARMA1. MALT1 contient également un domaine protéase similaire à celui retrouvé chez les caspases. Toutefois, MALT1 ne peut pas cliver le substrat des caspases ou encore induire l'apoptose, d'où son nom de paracaspase [127].

La fonction de MALT1 diffère dans les lymphocytes T et B. L'abolition de son gène chez la souris a révèlé le rôle clé de MALT1 pour l'activation optimale des lymphocytes T, leur prolifération et la sécrétion d'IL-2 en réponse à la stimulation du TCR [128, 129]. MALT1 y est ainsi requis pour l'activation de l'axe IKK/NF-κB et de la voie MAP kinases/JNK. En revanche, l'impact de MALT1 sur l'activation et la prolifération des lymphocytes B semble limité et l'activation de p65 suite à la stimulation du BCR est normale. Toutefois, le dimère BCL10/MALT1 est indispensable pour l'activation de c-Rel, ainsi que pour la survie des lymphocytes B [130].

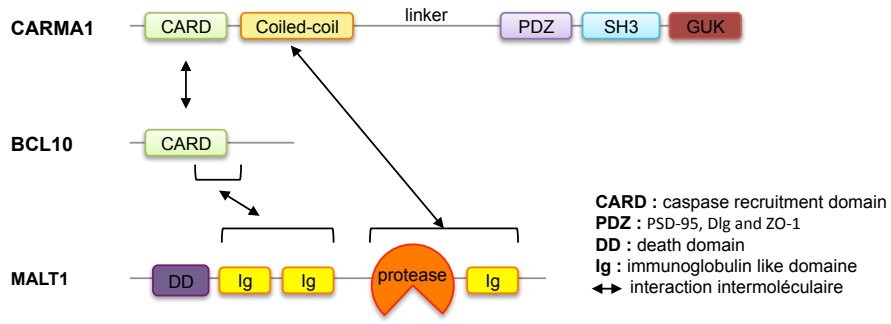


FIGURE 10 : *Composition du complexe CBM*

Le complexe CBM est formé de la protéine d'échafaudage CARMA1, de BCL10 et de la paracaspase MALT1.

❖ Architecture du complexe CBM

Lorsqu'il est surexprimé dans des cellules HEK293T, BCL10 forme des structures filamenteuses visualisables par microscopie confocale. L'ablation du domaine CARD de BCL10 abolit la formation de ces structures [131]. Ces structures supramoléculaires, nommées POLKADOTS, se forment également dans des lymphocytes T qu'elles "ponctuent" après activation du TCR. Elles contiennent notamment le complexe CBM et sont nécessaires pour l'activation de NF-κB [132, 133]. Par microscopie électronique, le groupe de Hao Wu a récemment montré que CARMA1 s'oligomérise et déclenche la formation de structures en filaments par BCL10 [134].

❖ Les composants associés au complexe CBM

L'analyse du CBM par filtration sur gel dans la lignée lymphoblastoïde T Jurkat stimulée par le TCR avec une combinaison de PMA et ionomycine a montré que sa masse apparente est supérieure à 1500 kDa, suggérant que le complexe CBM s'associe à de nombreux partenaires après sa formation [103]. Si la composition exacte de ce signalosome demeure inconnue, de nombreux partenaires du complexe CBM ont d'ores

et déjà été identifiés. On y retrouve par exemple des ubiquitine ligases (TRAF6, cIAP2), des déubiquitinylases (A20, USP9X), des kinases (RIP2, TAK1, CK1α, HPK1), des phosphatases (PP2A sur CARMA1, calcineurine sur BCL10) et diverses protéines (caspase-8, AIP, p62, GAKIN) [105, 108, 135-140].

I.2.C) Importance de l'activité catalytique de MALT1

A l'inverse des autres membres du complexe CBM, MALT1 n'est pas uniquement impliqué dans l'activation de NF-κB. En 2000, une analyse bio-informatique a mis en évidence la capacité de MALT1 à exercer une activité catalytique paracaspase [127]. Ce n'est toutefois qu'en 2008 que son importance pour l'activation lymphocytaire suite à la stimulation du TCR a été formellement démontrée [125]. La mutation du site catalytique de MALT1 ou son inhibition chimique avec le peptide zVRPR.fmk entraîne une réduction de la production d'IL-2 en dépit d'une activation normale de NF-κB [125, 136]. L'activation catalytique de MALT1 requiert sa dimérisation [141, 142], ainsi que la formation des structures filamenteuses par BCL10 [134]. Ainsi, ces filaments pourraient servir de plateforme pour la dimérisation et l'activation de l'activité catalytique de MALT1. A ce jour, plusieurs inhibiteurs de l'activité catalytique de MALT1 ont été mis au point comme la mépazine acétate, le promazide hydrochloride ou la molécule MI2 [143, 144].

En clivant plusieurs substrats, MALT1 impacte différents processus de l'activation lymphocytaire. Par exemple, le clivage des inhibiteurs de NF-κB RelB et A20 assure une activation optimale de NF-κB [145, 146]. Le clivage de CYLD pourrait contrôler le facteur de transcription AP-1 [147], tandis que celui de BCL10 module l'adhésion des lymphocytes T suite à la stimulation des récepteurs antigéniques [125]. Enfin, il a récemment été démontré que le clivage de roquin et regnase-1 par MALT1 est important pour la différentiation Th17 des lymphocytes T [148, 149], révélant ainsi un rôle insoupçonné de MALT1 dans la différenciation lymphocytaire indépendamment de NF-κB (Fig.11).

L'importance de l'activité de MALT1 a récemment été formellement prouvée avec la génération de souris knockin pour le site catalytique. Ceci permet de distinguer l'activité

catalytique de MALT1 de son rôle d'adaptateur. Tout comme les souris knockout pour le gène *malt1*, ces souris présentent de profonds défauts d'activation des lymphocytes, des cellules NK et des cellules dendritiques mais aussi des problèmes de développement des cellules B1 et des cellules B de la zone marginale. Cependant, à l'inverse des souris *malt1*$^{-/-}$, les souris knockin développent des problèmes d'autoimmunité liés à l'absence de lymphocytes T régulateurs, à l'accumulation de lymphocytes T avec un phénotype activés et au taux élevé d'immunoglobulines de type E et G1 et d'interféron γ dans le sang. Les souris knockin sont également associées à des troubles neurologiques [150, 151]. Enfin, les lymphocytes T et B issus de ces souris activent normalement NF-κB en réponse à la stimulation des récepteurs antigéniques [152]. Ainsi, ces données suggèrent que l'activité catalytique de MALT1 est centrale pour transmettre une réponse immunitaire indépendamment de NF-κB et serait également majeure dans d'autres processus physiologiques.

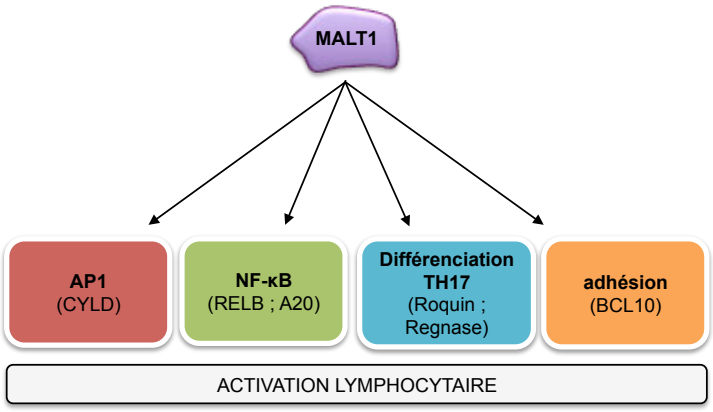


FIGURE 11 : *Activité catalytique de MALT1*

La paracaspase MALT1 est activée par la stimulation des récepteurs antigéniques. Plusieurs substrats de MALT1 sont connus. Les clivages de Roquin et Regnase sont nécessaires pour la différentiation TH17 des lymphocytes T. BCL10 clivé par MALT1 joue un rôle dans l'adhésion cellulaire. Les clivages de A20 et RelB permettent une activation optimale de NF-κB. Enfin, le clivage de CYLD régule le facteur de transcription AP1.

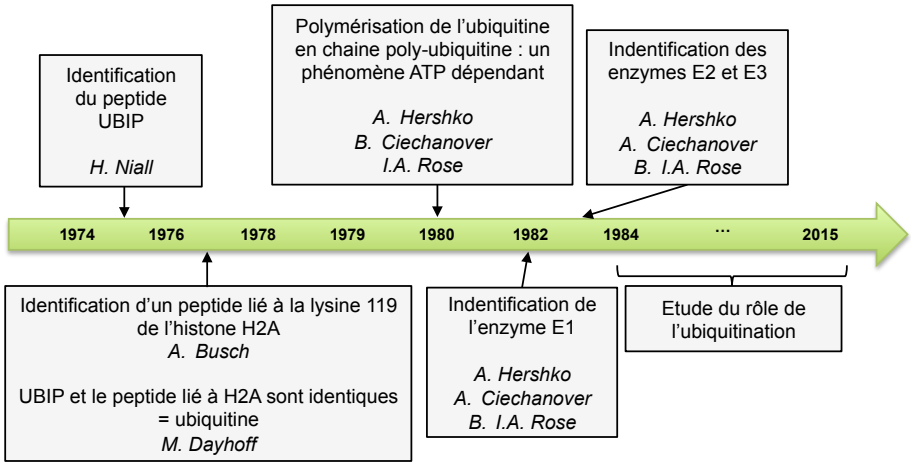
II) Les processus d'ubiquitination et leur importance dans l'activation de NF-κB

II.1) Mise en place des chaînes d'ubiquitine

II.1.A) L'ubiquitine : 40 d'histoire

Découverte de l'ubiquitine

Il y a tout juste 40 ans, en 1975, l'équipe de Hugh Niall qui travaille sur la myasthénie, une maladie neuromusculaire associée à des problèmes d'auto-immunité, isole à partir du thymus de veau un polypeptide capable d'induire *in vitro* l'expression de marqueurs de différentiation des lymphocytes T et B par des thymocytes. Ce peptide aussi exprimé par les végétaux, les bactéries et dans tous les tissus chez l'Homme sera appelé UBIP pour "Ubiquitous Immunopoietic Polypeptide" [153]. Deux an plus tard, Harris Busch et collègues montrent à partir d'extrait de thymus de veau, qu'un petit peptide est associé à la lysine 119 de l'histone 2A [154]. Cette même année, l'équipe de Margaret Dayhoff révèle que ces deux peptides sont en réalité identiques et introduit le nom d'ubiquitine [155]. Dans les années qui suivirent, Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin A. Rose (prix Nobel de Chimie en 2004) démontrent que l'ubiquitine se polymérise en chaîne d'ubiquitine sur des protéines cibles selon un mécanisme dépendant de l'ATP [156]. Puis très vite en 1982 et 1983, ils démontrent que ce processus dit d'ubiquitination nécessitent l'action conjuguée de trois enzymes E1, E2 et E3 [157, 158].



Frise chronologique : L'ubiquitine

Les différents types d'ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés et 8,5 kDa (Fig. 12A). Plusieurs acides aminés sont cruciaux pour la polymérisation de l'ubiquitine : la glycine COOH-terminale (G76), la méthionine NH_2-terminale (M1) ainsi que les 7 lysines internes (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) [159].

La réaction d'ubiquitination consiste en la création d'une liaison isopeptidique entre la glycine COOH-terminale d'une première molécule d'ubiquitine et une des 7 lysines d'une seconde molécule d'ubiquitine et ainsi de suite, donnant ainsi naissance à des chaînes différentes nommées K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63 (Fig.12B et 12C). Des liaisons isopeptidiques peuvent aussi se former entre la glycine COOH-terminale d'une première molécule d'ubiquitine et la méthionine NH_2-terminale de la molécule suivante donnant ainsi naissance à des chaînes dites linéaires ou M1 (Fig.12D). Ces chaînes d'ubiquitine diffèrent de par leur conformation. Alors que les chaînes K63 et linéaires ont une conformation "étendue" [160], les chaînes K48 prennent une conformation bien plus resserrée [161, 162]. Il a également été montré que certaines protéines peuvent être modifiées par l'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine, on parle alors de mono-ubiquitination. Dans tous les cas, ces modifications sont post-traductionnelles, et se forment à partir d'un résidu lysine d'une protéine cible [163, 164].

FIGURE 12 : *Structure de l'ubiquitine*

Figure issue de *Dikic I et al, 2009* (Ref 159)

Représentation structurale d'une molécule d'ubiquitine (A), de deux molécules d'ubiquitines liées par une liaison K48 (B), K63 (C) et M1 (D).

Rôle physiologique de l'ubiquitination

Si la fonction réelle de l'ubiquitine est restée longtemps mal caractérisée, on sait maintenant que cette modification post-traductionnelle joue un rôle clé dans de très nombreux processus physiologiques en contrôlant notamment la fonction, la localisation et la stabilité des protéines [165] (tableau 5). En outre, l'ubiquitination apparait aujourd'hui comme un phénomène central au sein des différentes voies menant à l'activation de NF-κB [166].

Les domaines UBD

Les domaines UBD pour "ubiquitin binding domain" sont présents sur un très large nombre de protéines. Ces domaines sont très variés, plus de vingt ont déjà été caractérisés et ce nombre croit très vite. Chaque domaine UBD peut lier les différentes chaînes d'ubiquitine avec plus ou moins d'affinité. Ainsi les protéines possédant un domaine UBD pourront interagir de manière dynamique avec une protéine ubiquitinilée [159, 180].

Tableau 5 : *Les différents types d'ubiquitination et leur implication dans les processus cellulaires*

type d'ubiquitination	fonction	références
Mono	*bien caractérisée* trafic cellulaire endocytose activité catalytique de MALT1	[175, 176]
K6	*peu caractérisée* réponse associée à la dégradation de l'ADN	[177, 179]
K11	*bien caractérisée* dégradation des protéines par le protéasome	[170]
K27	*peu caractérisée* réponse associée à la dégradation de l'ADN	[173]
K29	*peu caractérisée* dégradation des protéines par le protéasome régulation des AMP kinases	[168, 169]
K33	*peu caractérisée* trafic cellulaire régulation des AMP kinases	[169, 172]
K48	*bien caractérisée* dégradation des protéines par le protéasome	[171]
K63	*bien caractérisée* réponse associée à la dégradation de l'ADN trafic cellulaire réponse inflammatoire synthèse des ribosomes	[167]
M1	*bien caractérisée* activation de NF-κB ; immunité innée	[174]

II.1.B) Détail du mécanisme d'ubiquitination

Une réaction en trois étapes

Le processus d'ubiquitination requiert trois réactions séquentielles : l'activation, la conjugaison et la ligation qui sont catalysées par trois enzymes E1, E2 et E3 respectivement. L'activation nécessite l'hydrolyse de l'ATP et permet la formation d'une liaison thioester entre l'enzyme E1 et l'ubiquitine. La conjugaison assure le transfert de l'ubiquitine entre l'enzyme E1 et l'enzyme E2. Lors de la ligation, l'enzyme E3 catalyse la formation de la liaison isopeptidique entre la glycine COOH-terminale de l'ubiquitine et le groupe amine primaire (ε-amino) d'une lysine de la protéine cible (Fig.13) [157, 158, 165].

Le génome humain code pour 2 enzymes E1, 38 enzymes E2 et plus de 600 enzymes E3, rendant le mécanisme d'ubiquitination aussi complexe que spécifique [181]. Ainsi, par l'action conjuguée de cofacteurs, l'enzyme E2 serait responsable du type d'ubiquitination [182, 183]. L'enzyme E3 pourrait déterminer dans certains cas le type de chaînes d'ubiquitine indépendamment de l'enzyme E2 mais serait surtout responsable du choix spécifique de la protéine cible [184, 185].

FIGURE 13 : *Mise en place des chaînes d'ubiquitine*

Figure issue de *Dikic I et al, 2009* (Ref 159)

L'ubiquitination est mise en place selon trois étapes successives catalysées par trois enzymes E1, E2 et E3. La première étape dite d'activation est catalysée par l'enzyme E1. Elle consiste en la formation d'une liaison thioester entre E1 et l'ubiquitine et nécessite l'hydrolyse de l'ATP. La seconde étape dite de conjugaison consiste au transfert de la molécule d'ubiquitine de l'enzyme E1 vers l'enzyme E2. Enfin, pendant la troisième étape dite de ligation, l'enzyme E3 catalyse la formation de la liaison isopeptidique entre la glycine carboxy terminale de l'ubiquitine et la lysine de la protéine cible.

Les E3 ligases

Les enzymes E3, aussi nommées E3 ligases, sont classées en trois familles sur une base structurale et selon le mécanisme quelles emploient pour catalyser le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers le substrat.

Une première famille d'E3 ligases est caractérisée par la présence d'une séquence consensus riche en cystéine et en histidine qui lie deux ions zinc, appelée RING ("Really Intersting New Gene") [185]. Une deuxième famille arbore un domaine HECT ("Homology to E6AP C Terminus") qui est une séquence basique localisée à l'extrémité carboxy-terminale [186]. Enfin, la troisième famille contient un domaine RBR ("RING between RING"). Ce motif est composé de deux RING (RING1 et RING2) séparés par un IBR ("In-Between RING") [187].

Les domaines RING, HECT et RBR sont à l'origine de l'activité E3 ligase portée par la protéine et différent par leur mode d'action. En effet, les E3 ligase de la famille RING catalysent un transfert direct de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers son substrat, pour cela ces E3 ligases ont la particularité de pouvoir lier en même temps l'enzyme E2, l'ubiquitine et la protéine cible [188]. Les E3 ligases des familles HECT et RBR catalysent le transfert de l'ubiquitine en deux étapes: l'ubiquitine est d'abord liée sur une cystéine de l'E3 ligase avant d'être transférée au substrat (Fig. 14) [187, 189].

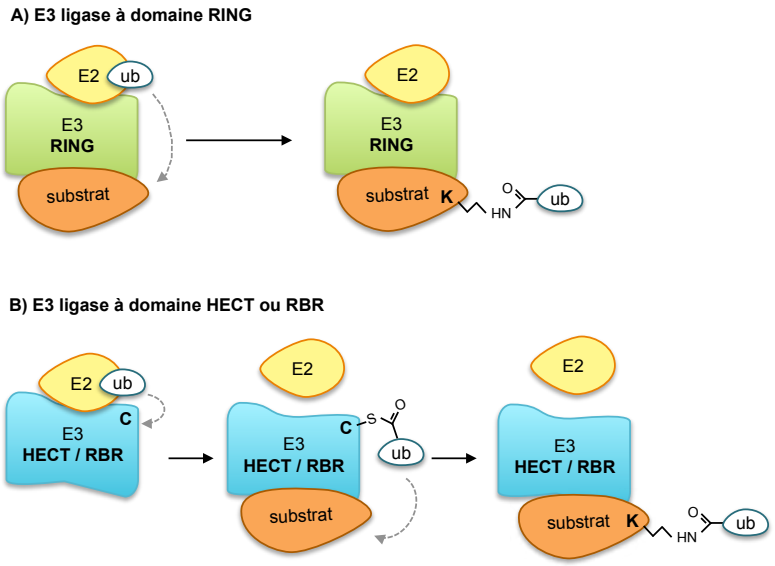


FIGURE 14 : *Mécanisme d'ubiquitination par les E3 ligases HECT, RBR et RING*

A) Les E3 ligases à domaine RING sont capables de lier en même temps l'E2 et la protéine cible (substrat). Elles catalysent un transfert directe de l'ubiquitine de l'E2 vers le substrat. Une liaison isopeptidique entre la glycine G76 terminale de l'ubiquitine et une lysine de la protéine cible est alors crée.

B) Les E3 ligases à domaine HECT ou RBR lient d'abord l'enzyme E2 complexée à l'ubiquitine. Une liaison thioester est alors formée entre une cystéine de l'E3 ligase et l'ubiquitine. Puis, l'E3 ligase se lie au substrat et catalyse la liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et la protéine cible.

Le rôle des déubiquitinylase (DUB)

Les déubiquitinylase ou DUB sont des protéases qui clivent les liaisons iso-peptidiques entre deux molécules d'ubiquitine ou entre une molécule d'ubiquitine et son substrat. Le génome humain code pour environ 100 DUBs qui sont classées en 5 familles différentes

selon leurs domaines structuraux. Ainsi, 60 DUB font partie de la famille UPS (Ubiquitin Specific Protease) et 14 font partie de la famille OTU (Ovarian Tumor Protease). Enfin les familles MJD (Machado Joseph Disease Protein Domain Protease), JAMM (JAB1/MPN/Mov37 Metalloproteases) et UCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolase) comprennent chacune quatre DUB [190].

II.2) Ubiquitination et activation de NF-κB en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques

II.2.A) Ubiquitination des IκBs

Ubiquitination K48 des IκBs et dégradation

En 1993, l'équipe de Patrick Baeuerle découvre que l'inhibiteur de NF-κB, IκBα est rapidement dégradé en réponse au phorbol ester, à l'IL-1β, au LPS et au TNFα. Sa demi-vie passe ainsi de 138 à 1,5 minutes après traitement [191]. Il sera par la suite montré qu'en réponse aux différents stimuli aboutissant à l'activation de NF-κB, le complexe IKK phosphoryle IκB qui est alors la cible d'ubiquitination de type K48 [49]. A l'exception de p100, tous les IκBs subissent alors une dégradation complète par le protéasome. Seul le segment comprenant l'extrémité carboxy-terminale jusqu'au domaine GR (domaine riche en glycine) de p100 est digéré. Le domaine GR protège la région NH_2-terminale de l'action du protéasome. Tandis que les motifs ankyrin typiques de la famille IκB sont dégradés, le domaine RHD typique de la famille NF-κB est lui conservé pour donner la forme active de NF-κB p52 [192].

Le complexe SCF-βTrCP

Le complexe SCF-βTrCP reconnait les IκBs phosphorylés et assure leur ubiquitination K48. Dans ce complexe, la protéine d'échafaudage Cullin1 joue un rôle central. Son extrémité carboxy-terminale interagit avec l'E3 ligase RBX1 et son domaine amino-terminal s'associe avec l'adaptateur SKP1 pour former le complexe SCF. L'adaptateur SKP1 autorise le recrutement

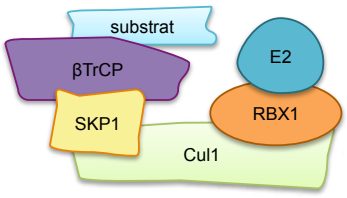


FIGURE 15 : *Composition du complexe SCF-βTrC*

Le complexe SCF-βTrCP est composé de la protéine d'échafaudage Culin1, de l'E3 ligase RBX1, d'une enzyme E2, de l'adaptateur SKP1 et de la F-box βTrCP .

de la βTrCP qui est une protéine de la famille F-box afin de former le complexe SCF-βTrCP (Fig.15) [193]. La famille F-box se compose d'environ 70 protéines, dont chacun des membres peut reconnaitre une séquence particulière d'aminoacides. Ainsi, le recrutement d'une protéine F-box par le complexe SCF est à l'origine de la spécificité de substrat. La F-box βTrCP présente la particularité de reconnaitre le motif nommé WD-40: DSGXXS (S = résidus sérines phosphorylés) porté par les IκBs [194, 195].

II.2.B) Ubiquitination au coeur des complexes CBM et IKK

Ubiquitination de BCL10

S'il est bien établi que BCL10 est ubiquitinylé en réponse à l'engagement du TCR, la nature des chaînes d'ubiquitine associées à BCL10 ainsi que l'identité de l'E3 ligase restent controversées. Deux groupes ont ainsi suggéré que l'ubiquitination de BCL10 conduirait à sa dégradation par les lysosomes [118, 119]. Les E3 ligases NEDD4 associée à ITCH [118] et cIAP2 [196] pourraient contrôler cette régulation post-traductionnelle. Il a également été proposé que BCL10 soit ubiquitinylé par des chaînes K48 dans le noyau par la βTrCP puis dégradé par le protéasome [117]. A contrario, plusieurs travaux décrivent l'ubiquitination K63 de BCL10 sur ses résidus lysines K31 et K63 en réponse à l'engagement du TCR [104, 119, 197, 198]. La mutation de ces sites en arginine n'altère pas la formation du CBM, mais le recrutement du complexe IKK au niveau du CBM et l'activation de NF-κB sont réduits [104]. Il a aussi été proposé que l'ubiquitination de type K63 survient dès 5 minutes post-stimulation, et une deuxième vague d'ubiquitination K48 apparaîtrait secondairement 20 minutes après l'engagement du récepteur [104]. En accord avec ceci, le domaine UBD ("Ubiquitin Binding Domain") de NEMO possède une affinité pour les chaînes d'ubiquitine K63 mais pas pour les chaînes K48 [77]. L'ubiquitination K63 de BCL10 autoriserait donc rapidement le recrutement du complexe IKK au complexe CBM et son activation via l'interaction de NEMO avec BCL10. Dans un second temps, l'ubiquitination K48 de BCL10 permettrait au complexe IKK de se dissocier du complexe CBM, ramenant ainsi les cellules à l'état basal.

Ubiquitination de MALT1

- Ubiquitination K63 de MALT1 et activation du complexe IKK

En réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques, il a été établi que la partie COOH-terminale de MALT1 subit une ubiquitination K63 [103, 197]. A l'instar de BCL10, ceci pourrait servir de plateforme pour le recrutement et l'activation du complexe IKK. Là encore, la nature de l'E3 ligase en charge d'ubiquitinyler MALT1 n'est pas encore formellement établie. Dans un modèle ectopique utilisant des cellules HEK293T il a été montré que TRAF6 catalyse l'ubiquitination de MALT1. D'ailleurs, TRAF6 s'associe à MALT1 après activation du TCR et est requis pour l'ubiquitination de MALT1 dans des cellules Jurkat [103]. En purifiant MALT1, BCL10, TAK1 et TRAF6 afin de tester leur capacité à activer IKK *in vitro,* Zhijian Chen et collègues suggèrent que BCL10 et MALT1 servent de plateforme pour l'oligomérisation et la polyubiquitination de TRAF6. En retour, TRAF6 ubiquitinyle NEMO et active le complexe IKK [105]. TRAF6 pourrait être à la fois l'ubiquitine ligase de MALT1 et de NEMO.

Le rôle de TRAF6 semble être en réalité plus complexe. En effet, TRAF6 n'est qu'imperceptiblement exprimé dans les lymphocytes primaires et son expression dépend de l'activation du TCR. De plus, les souris knockout pour TRAF6 dans leurs lymphocytes T uniquement (traf6ΔT) naissent normalement mais développent très vite une splénomégalie et des lymphadénopathies. Elles présentent un nombre réduit de lymphocytes T $CD4^+$ mais aussi un nombre anormalement élevé de lymphocytes T $CD8^+$ et de lymphocytes B qui déclenchent une réponse exacerbée en réponse à divers stimuli. TRAF6 aurait donc un rôle essentiel dans l'homéostasie et la maintenance du système immunitaire adaptatif [199].

- Mono-ubiquitination de MALT1

En 2013, Margot Thome et son équipe ont révélé que MALT1 subit une mono-ubiquitination sur sa lysine K644 en réponse à l'engagement du TCR. La mutation de cette lysine en arginine dans des cellules HEK293T suggère que cette étape est décisive pour l'initiation de l'activité catalytique de MALT1. Il est également montré que la formation du complexe CBM est requise pour la mono-ubiquitination de MALT1 [176]. Plus récemment, il a été mis en évidence que l'activité paracaspase de MALT1 n'est pas strictement dépendante du résidu K644 [200]. L'E3 ligase responsable de cette mono-

ubiquitination n'étant pas encore caractérisée le mystère reste entier quant à ce phénomène.

Ubiquitination de CARMA1

Lors de la stimulation du TCR, CARMA1 est sujet à une ubiqiutination K48 puis est dégradé par le protéasome. Ceci pourrait permettre de lever l'activation de NF-κB et de la kinase JNK [201].

Ubiquitination de NEMO

L'ubiquitination de NEMO en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques fait débat. Deux études montrent que l'ubiquitination K63 de NEMO sur sa lysine K399 est indispensable pour induire l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation du TCR. TRAF6 pourrait être l'E3 ligase responsable de l'ubiquitination de NEMO [105, 106, 202]. En 2008, les souris exprimant NEMO avec la lysine K392 (équivalente de la lysine K399 chez l'Homme) mutée en arginine (K392R) sont générées. Cependant, lorsque l'ubiquitination de NEMO est abolie, NF-κB est correctement activé dans les lymphocytes T issus de ces souris et stimulés par leur TCR [203]. Ainsi, si l'ubiquitination de NEMO est clairement établie en réponse à de nombreux stimuli [204], son rôle dans la voie des récepteurs antigéniques reste énigmatique.

II.2.C) L'ubiquitination linéaire et son implication dans l'activation de NF-κB

Le complexe LUBAC

- Présentation du complexe LUBAC

L'existence de l'ubiquitination de type linéaire a été mise en évidence pour la première fois en 2006 par le groupe de Kasuhiro Iwai. Ce type d'ubiquitination est catalysé par un complexe nommé LUBAC pour "Linear Ubiquitin Chain Assembly Complexe" [205]. Ce complexe évalué par fitration sur gel à 600 kDa est constitutivement formé dans les cellules par HOIL-1, HOIP et SHARPIN [205-208]. Des interactions sont établies entre les membres du LUBAC : le domaine UBL (Ubiquitin Like Domain) de HOIL-1 s'associe au domaine UBA (Ubiquitin Associated Domain) de HOIP et le domaine UBL de SHARPIN lie l'un des domaine en doigt de zinc de HOIP (Fig.16) [205, 208-210]. La

surexpression dans des cellules HEK293T de HOIP et HOIL-1, ou HOIP et SHARPIN, ou HOIP et HOIL-1 et SHARPIN active NF-κB, suggérant la possibilité que trois complexes LUBAC différents peuvent exister [207, 208]. Enfin, il existe une interdépendance entre les trois membres puisque la réduction de l'expression de l'un des membres par ARN interférence ou par knockout induit une réduction de l'expression des deux autres membres [206, 207].

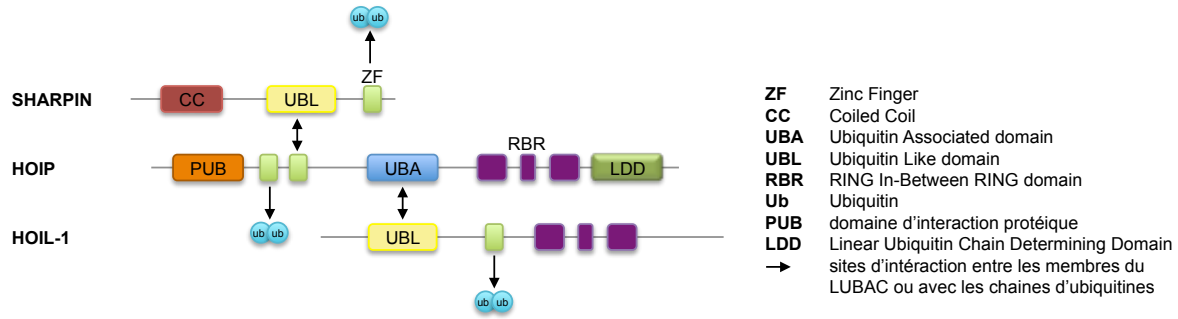


FIGURE 16 : *Le complexe LUBAC*

Le complexe LUBAC est formé de SHARPIN, HOIP et HOIL1. HOIP et HOIL-1 sont des E3 ubiquitine ligases qui possèdent un domaine RBR. Les domaines ZF de HOIP, HOIL-1 et SHARPIN permettent des interactions avec des chaines d'ubiquitine. Le domaine UBL de SHARPIN interagit avec un des domaines ZF de HOIP et le domaine UBL de HOIL-1 interagit avec le domaine UBA de HOIP.

❖ HOIL-1

HOIL-1 (Heme-Oxidized Iron-regulatory protein 2 ubiquitin Ligase-1) a d'abord été caractérisé comme un régulateur dans le transport du fer avant d'être identifié comme un membre du complexe LUBAC [211]. HOIL-1 est une E3 ligase qui présente un domaine RBR. Son domaine en doigt de zinc lui permet de lier les molécules d'ubiquitine. HOIL-1 possède des domaines structuraux très proches de Parkin (RBR et UBL) [212], une E3 ligase dont l'auto-inhibition par son domaine UBL être réversée par la fixation de son substrat [213]. Il a également donc été proposé que HOIL-1 pourrait fonctionner en tant qu'auto-inhibiteur de l'activité du complexe LUBAC [214].

Les souris knockout pour HOIL-1 ont été générées mais ne sont pas bien décrites dans la littérature. Une étude récente montre toutefois que ces animaux sont sujets à une amylopectinose[1] au niveau du myocarde. Ces souris ont un nombre normal de cellules lymphoïdes dans la rate, le thymus et le sang mais ont plus de lymphocytes T et B et de macrophages dans le péritoine. Ces souris sont également hautement susceptibles à des infections bactériennes, pour lesquelles elles développent très rapidement des

[1] dépôt de glycogène dans les cellules musculaires conduisant à une myopathie
[2] cellules sécrétrices d'anticorps

lésions inflammatoires [215]. En outre, les études portant sur les cellules B, les kératinocytes, et les fibroblastes issus des souris HOIL-1$^{-/-}$ révèlent l'importance de HOIL-1 dans l'activation de NF-κB en réponse au TNFα, à IL-1β, au LPS, au CD40L et suite à un stress génotoxique [206-209, 216].

Des patients déficients pour HOIL-1 ont aussi été caractérisés par différentes équipes. Les trois premiers patients décrits souffraient à la fois d'immunodéficience et d'auto-inflammation, mais aussi d'amylopectinose, et de myopathie. Les fibroblastes issus de ces patients présentent des défauts d'activation de NF-κB en réponse au TNFα et à l'IL-1β alors que les monocytes sont hypersensibles à l'IL-1β [217, 218]. Les patients décrits par la suite souffraient uniquement d'amylopectinose et de cardiomyopathie [219, 220].

❖ HOIP

HOIP (HOIL-1 Interacting Protein) a été identifié comme une protéine qui interagit avec HOIL-1 [205]. A l'instar de HOIL-1, HOIP est une E3 ligase de la classe des RBR. Fait important, seul HOIP porte l'activité catalytique du complexe [209]. HOIP est aussi composé de domaines en doigt de zinc qui lui permettent de lier l'ubiquitine, et un domaine unique LDD pour "Linear Ubiquitin Chain Determining Domain" qui lui permet de lier la déubiquitinylase OTULIN (cf chapitre II.2.D) [210].

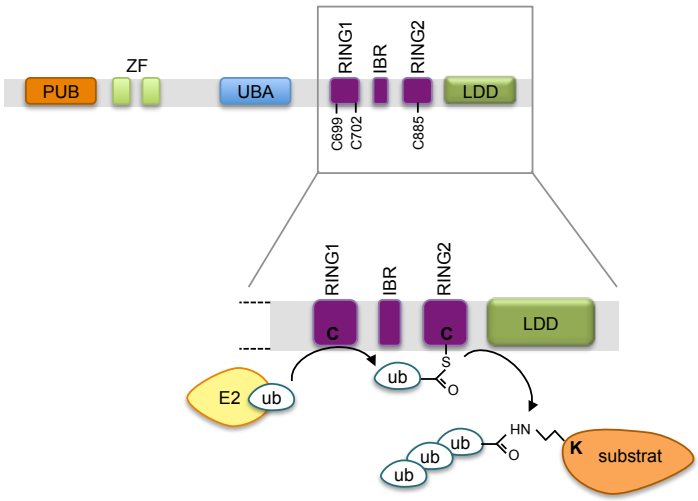


FIGURE 17 : HOIP : *relation structure/fonction*

HOIP est une E3 ligase à domaine RBR qui catalyse l'ubiquitination selon un mécanisme mixte. Une liaison thioester est d'abord formée entre l'ubiquitine et la cystéine C885 du domaine RING2 de HOIP. Puis les domaines RING2 et LDD permettent la formation de la liaison isopeptidique entre la protéine cible et l'ubiquitine.

Des tests d'ubiquitination linéaire *in vitro* utilisant différentes formes tronquées ou mutées de HOIP ainsi que des analyses de structure ont permis de déterminer comment HOIP catalyse l'ubiquitination linéaire. Ces études ont révélé un mécanisme unique et original. Dans un premier temps, les domaines RING1 et IBR de HOIP catalysent le transfert de l'ubiquitine de l'E2 vers le domaine RING2. Une liaison thioester s'établie alors entre la cystéine C885 du domaine RING2 et l'ubiquitine. Puis les domaines

RING2 et LDD catalysent la liaison isopetidique entre la molécule d'ubiquitine et la chaîne d'ubiquitine en cours de formation. Ainsi, plusieurs résidus cystéines (C699, C702 et C885) appartenant au domaine RBR ont été identifiés comme critiques pour l'activité E3 ligase de HOIP (Fig.17) [210, 221].

L'ablation du gène de HOIP chez la souris est létale. En l'absence de HOIP le récepteur 1 au TNF (TNFR1) est activé de façon aberrante et entraine l'apoptose des cellules endothéliales, l'absence de vascularisation et donc la mort de l'embryon. Ce phénomène est partiellement contrebalancé par l'absence du TNF puisque les embryons doubles knockout $HOIP^{-/-}$ $TNF^{-/-}$ présentent d'abord une vascularisation normale puis meurent avant la naissance car leur réseau vasculaire se détériore [222]. Pour palier à ce problème, des souris délétées pour le domaine RBR de HOIP dans les cellules B uniquement ont été générées en 2013. Ces souris $HOIP^{\Delta linear}$, ont un nombre faible de lymphocytes B1 et l'activation de NF-κB et de ERK est compromise en réponse à l'activation du CD40, des TLRs (Toll Like Receptor) et du TNF récepteur TACI. Cependant, dans les lymphocytes B $HOIP^{\Delta linear}$ NF-κB et ERK sont correctement activés en réponse à la stimulation du BCR [223].
Récemment, un patient possédant une mutation non-sens dans le domaine PUB de HOIP a été caractérisé. Ce patient a un phénotype atypique, puisqu'il souffre d'inflammation de plusieurs organes conjuguée à une immunodéficience. L'activation de NF-κB est fortement compromise dans les fibroblastes issus de ce patient en réponse au TNFα et à l'IL-1β, et dans les lymphocytes B en réponse à la stimulation du CD40. Cependant, les monocytes issus de ces patients hyper-répondent à l'IL-1β [224].

- SHARPIN

SHARPIN a été identifié en 2011 comme un nouveau membre du complexe LUBAC par homologie de séquence. En effet, la région COOH-terminale de SHARPIN qui contient les domaines UBL et ZF est proche de la partie amino-terminale de HOIL-1 qui contient également ces domaines. Les souris n'exprimant pas le gène de sharpin à cause de mutations ont été identifiées avant que le rôle de SHARPIN ne soit caractérisé. Ces souris nommées *cpdm* pour "Chronic Proliferative Dermatitis in Mice" sont viables mais présentent de nombreux défauts. Elles développent des lésions cutanées liées à des inflammations chroniques; une infiltration des granulocytes, des macrophages, et des eosinophiles dans le derme et l'épiderme; une splénomégalie. Des défauts de

développement des organes lymphoïdes secondaires et de production de cytokines pro-inflammatoires Th1 ont également été notés [225]. Tout comme HOIL-1, les études portant sur les cellules B, les kératinocytes, et les fibroblastes issus des souris *cpdm* ont démontré l'importance de SHARPIN dans l'activation de NF-κB en réponse au TNFα, à IL-1β, au LPS, au CD40L et suite à un stress génotoxique [206-209, 216].

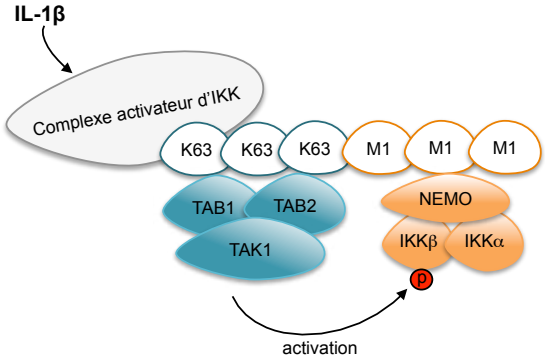


FIGURE 18 : *Mise en place des chaînes d'ubiquitine mixtes K63/linéaire en réponse à l'IL-1β*

TAB1 et TAB2 se lient préférentiellement aux chaînes d'ubiquitine K63 alors que NEMO lie préférentiellement les chaînes d'ubiquitine M1. Ceci permet le rapprochement physique des complexes TAK1/TAB1/TAB2 et IKK au niveau du complexe activateur d'IKK. TAK1 peut alors phosphoryler IKKβ et activer IKK.

Implication du LUBAC dans l'activation de NF-κB

- Ubiquitination linéraire et activation d'IKK

Comment le complexe LUBAC participe t'il à l'activation de NF-κB? Kasuhiro Iwai et son équipe ont montré que le LUBAC peut induire *in vitro* l'ubiquitination linéaire de NEMO sur les lysines K285 et K309 [206, 209]. NEMO est également la cible d'ubiquitination linéaire en réponse à du TNFα dans les fibroblastes et dans les cellules HEK293T en réponse à un stress génotoxique [206, 216]. D'ailleurs, le LUBAC peut s'associer aux récepteurs TNFR et CD40 pour catalyser l'ubiquitination linéaire de NEMO en réponse au CD40L ainsi que de NEMO et RIP1 en réponse à du TNFα [208, 226].

Des données structurales montrent que le domaine UBD (Ubiquitin Binding Domain) de NEMO possède une très forte affinité pour l'ubiquitine de type linéaire. La lysine acceptrice d'ubiquitine K309 de NEMO est comprise dans ce domaine et son ubiquitination linéaire pourrait modifier l'affinité de l'UBD pour les chaînes d'ubiquitine [227, 228]. Ainsi, ces différentes études suggèrent que le LUBAC pourrait avoir deux fonctions essentielles lors de l'activation de NF-κB. D'une part le LUBAC pourrait induire l'ubiquitination linéaire d'adaptateurs comme RIP1 et ainsi permettre le recrutement de NEMO au niveau de son complexe activateur. Dans un second temps, le LUBAC pourrait ubiquitinyler NEMO et promouvoir le relargage d'IKK dans le cytosol pour y phosphoryler l'inhibiteur de NF-κB (IκB).

❖ Ubiquitination mixte K63 et linéraire

En 2013, Philip Cohen et son équipe proposent un modèle élégant mettant en jeu une ubiquitination mixte K63 et linéaire. Dans des cellules HEK293T stimulées par de l'IL-1β, les protéines du complexe activateur d'IKK (IRAK1, IRAK4 et MyD88) arborent des chaînes polyubiquitine mixtes K63 et linéaires. IRAK1, IRAK4 et MyD88 subissent d'abord une ubiquitination K63 qui précède l'ubiquitination linéaire. Fait important, HOIP reconnait les chaînes K63 associées à IRAK1, IRAK4 et Myd88 et catalyse leur ubiquitination linéaire [229]. Les chaînes d'ubiquitine K63 pourraient donc servir au recrutement du complexe TAK1/TAB1/TAB2 au niveau du complexe activateur d'IKK [230] et les chaînes d'ubiquitne linéaire permettraient le recrutement de NEMO [227, 228]. Ce mécanisme expliquerait le rapprochement des complexes TAK1/TAB1/TAB2 et IKK et donc l'activation d'IKK par TAK1 (cf chapitre I.1.C et Fig. 18) [229].

II.2.D) Les DUB célèbres dans le contrôle de l'activation de NF-κB

❖ A20

A20, aussi appelé TNFAIP3, possède un domaine OTU dans son domaine amino-terminal qui lui confère son activité DUB (Fig.19) [231]. A20 est connu pour réguler négativement NF-κB en réponse à du TNFα à l'IL-1β et suite à l'engagement des récepteurs antigéniques [136, 232, 233]. D'ailleurs, A20 réverse l'ubiquitination de MALT1 et restreint ainsi l'activation du complexe IKK et de NF-κB en réponse à l'activation du TCR [136]. Cependant, alors qu'une première étude publiée en 2008 montre qu'*in vitro* A20 peut cliver des chaînes d'ubiquitine K48 et K63 [234], une seconde étude publiée en 2009 met en évidence qu'A20 ne peut cliver que des chaînes K48 [160]. En parallèle de son activité DUB, A20 possède aussi une activité E3 ligase porté par deux domaines en doigt de zinc. En réponse au TNFα A20 permet l'ubiquitination K48 de RIP1 qui est ensuite dégradé par le protéasome. De cette façon A20 restreint le signal d'activation de NF-κB [235].

Les souris knockout pour A20 meurent prématurément, elles souffrent d'inflammation au niveau de plusieurs organes, de perte de poids, d'atrophie musculaire... corrélés à une activation persistante de NF-κB. Ces souris tnfaip3$^{-/-}$ hyper-répondent et succombent

suite à l'injection de TNFα ou de LPS [236]. Ainsi, la déubiquitinylase A20 joue un rôle majeur dans la régulation de l'activation de NF-κB et dans la réponse immunitaire.

❖ CYLD

CYLD (cylindromatosis) est une déubiquitinylase, dont le domaine catalytique USP est situé dans son extrémité COOH-terminale (Fig.19). En réponse à différents stimuli, il a été montré que CYLD participe à la régulation négative de NF-κB [237-239] et de la kinase JNK [240]. Plus particulièrement, en réponse à l'engagement du TCR CYLD réverse l'ubiquitination de TAK1 et prévient ainsi une activation aberrante de NF-κB [241]. De manière intéressante, une étude montre qu'*in vitro* CYLD peut cliver les chaînes d'ubiquitine K63 et linéaire [160].

Les souris cyld$^{-/-}$ affichent un nombre réduit de lymphocytes T CD4^{+} et CD8^{+}. Les lymphocytes T et B issus de ces souris ont une réponse exacerbée suite à l'engagement des récepteurs antigéniques. Les lymphocytes B eux présentent une activation constitutive d'IKK et de NF-κB [241-243]. Les souris cyld$^{-/-}$ sont sujettes à de multiple inflammations, et au développement de tumeurs de la peau et du colon [244, 245]. Ces souris révèlent donc le rôle central de CYLD dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire.

❖ OTULIN

OTULIN ou gumby a été identifié en 2013 comme la déubiquitinylase des chaînes linéaires. Dans des cellules HEK293T, la surexpression d'OTULIN contrecarre l'activation de NF-κB induite par la surexpression de HOIL-1 et HOIP et diminue l'accumulation de chaînes d'ubiquitine linéaires [246]. Il apparait qu'OTULIN et le LUBAC interagissent de manière dynamique en réponse à du TNFα. De plus, la surexpression d'OTULIN dans des cellules HEK293T inhibe l'ubiquitination linéaire de RIP1 et l'activation de NF-κB en réponse à du TNFα. En parallèle, la réduction de l'expression d'OTULIN par ARN interférence augmente l'ubiquitination de RIP1 et l'activation de NF-κB. Tout concorde donc pour dire qu'OTULIN s'associe de manière dynamique au complexe LUBAC pour restreindre son action [247, 248].

En 2014, deux études basées sur les structures de HOIP et OTULIN révèlent que le domaine PUB (**P**eptide:Nglycanase/**UB**A or UBX-containing proteins) de HOIP s'associe au domaine PIM (PUB Interacting Motif) d'OTULIN (Fig.19). L'emploi de différentes

formes mutées de HOIP et OTULIN dans leur domaine PUB et PIM indique que l'interaction entre HOIP et OTULIN est nécessaire pour le recrutement d'OTULIN au niveau du récepteur au TNF et pour inhiber l'activation de NF-κB en réponse au TNFα. De plus, la phosphorylation d'OTULIN sur son résidu tyrosine 56 situé dans le domaine PIM compromet l'interaction entre OTULIN et HOIP et lève l'effet inhibiteur d'OTULIN sur NF-κB. Ainsi, l'interaction entre HOIP et OTULIN permet de maintenir un état basal des cellules. En réponse à du TNFα la phosphorylation du résidu Y56 d'OTULIN induit la dissociation de HOIP et OTULIN et autorise l'activité du LUBAC (Fig.20) [249, 250]. Les souris gumby$^{-/-}$ suggèrent qu'OTULIN exerce également un rôle dans les processus d'angiogénèse et l'absence de vascularisation est létale [246].

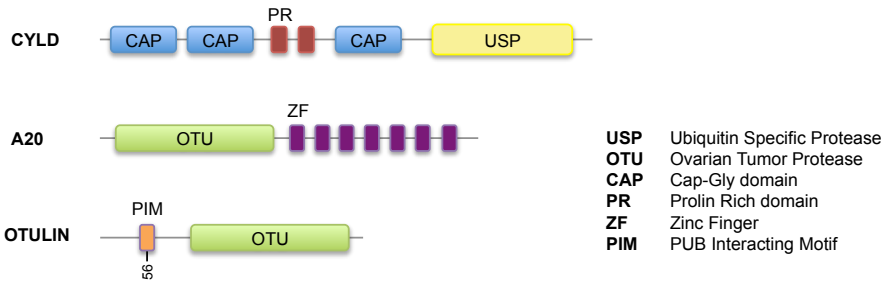


FIGURE 19 : *Les DUB célèbres dans l'activation de NF-κB*

CYLD, A20 et OTULIN sont des DUB impliquées dans le contrôle de l'activation de NF-κB. CYLD possède un domaine USP (Ubiquitin Specific Protease) à l'origine de son activité DUB, alors que A20 et OTULIN sont des DUB avec un domaine OTU (Ovarian Tumor Protease). Les domaines CAP, PR, ZF et PIM permettent d'établir des interactions inter-protéiques.

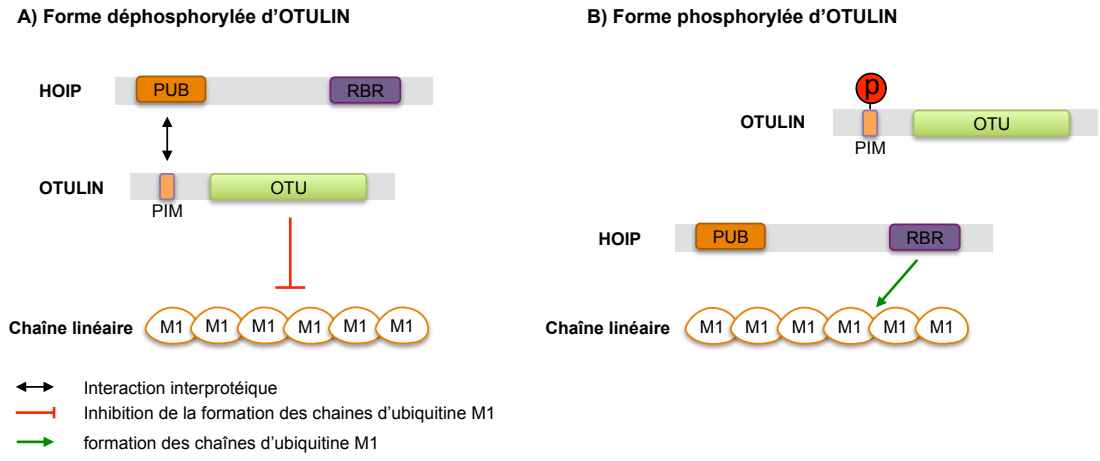


FIGURE 20 : *Mode d'action d'OTULIN*

A) Le domaine PIM d'OTULIN interagit avec le domaine PUB de HOIP et empêche ainsi la formation des chaînes d'ubiquitine linéaires par le complexe LUBAC.
B) Le résidu tyrosine 56 situé dans le domaine PIM d'OTULIN est phosphorylé. L'interaction entre OTULIN est HOIP est compromise et OTULIN n'empêche plus la formation des chaînes d'ubiquitine linéaires par le complexe LUBAC.

III) Le lymphome diffus à grandes cellules B : ABC DLBCL

III.1) Présentation du lymphome diffus à grandes cellules B

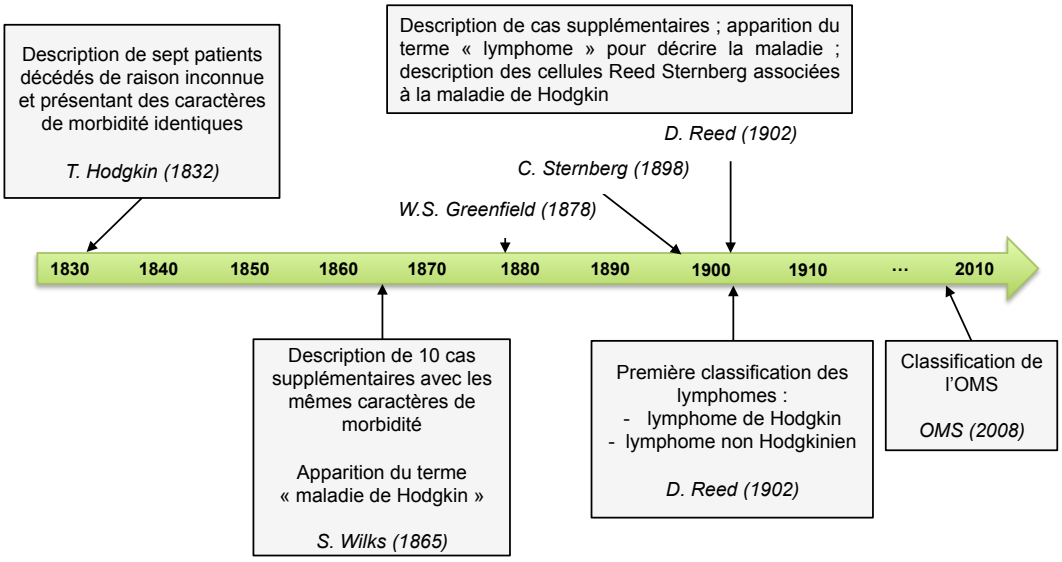
III.1.A) De Thomas Hodgkin à aujourd'hui

Le lymphome résulte d'une prolifération anormale des cellules du système immunitaire, c'est à dire des cellules situées notamment dans les ganglions lymphatiques, la lymphe, la rate et la moelle osseuse. Les premières descriptions de lymphomes par le médecin britannique Thomas Hodgkin datent de 1832. Il détaille dans une publication les autopsies de sept patients d'âge et de sexe différents et décédés pour des raisons inconnues. Dans cette étude, Thomas Hodgkin montre que ces patients ont tous en commun des ganglions lymphatiques et une rate surdimensionnés. Il en conclut que la taille anormalement grande des ganglions et/ou de la rate est un signe de morbidité [251]. En 1865, Samuel Wilks ajoute dix cas supplémentaires et donne des détails sur les symptômes associés à cette maladie qu'il appellera "maladie de Hodgkin". Les patients décrits souffrent en particulier d'anémie, de fièvre par intermittence et ont un niveau bas de globules rouge [252]. Puis en 1878, 1898 et 1902, les médecins William Smith Greenfield, Carl Sternberg et Dorothy Reed respectivement, observeront que la maladie de Hodgkin est associée à la présence de cellules anormalement grandes avec deux ou trois noyaux dans les ganglions [253-255]. Ces grandes cellules en réalité mononuclées mais avec un noyau volumineux et polylobé seront nommées "cellules de Reed Sternberg".

Depuis Thomas Hodgkin et Samuel Wiliks, de nombreux autres cas seront recensés et la maladie de Hodgkin sera nommée plus largement lymphome. La première classification de lymphomes sera établie en 1902 et discrimine les lymphomes dits "Hodgkiniens" caractérisés par les cellules de Reed Sternberg, des autres lymphomes dits "non Hodgkiniens" [255]. Depuis, de très nombreuses classifications ont été réalisées et se sont complexifiées au cours des années et des découvertes. En 2008, l'organisation mondiale de la santé a établie une classification complexe qui est régulièrement mise à jour. Les lymphomes sont toujours séparés en deux grands groupes : les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes non Hodgkiniens, mais de

nombreux autres critères sont pris en compte pour discriminer les différents types de lymphomes, comme la morphologie et l'immunophénotype de la tumeur, certains marqueurs génétiques sont également pris en compte...[256]

Le lymphome diffus à grandes cellules B, LDGCB, ou DLBCL pour l'acronyme anglais "Diffuse Large B Cell Lymphoma" est le lymphome B non Hodgkinien (B-LNH) le plus fréquemment diagnostiqué, il touche 3000 à 4000 nouvelles personnes chaque année en France selon l'association France Lymphome Espoir.



Frise chronologique : De la première observation du lymphome à la classification de l'OMS en 2008

III.1.B) Un peu de physiologie pour mieux comprendre l'origine du lymphome à grandes cellules B

Le système lymphatique

Le système lymphatique est une composante majeure du système immunitaire. Il comprend un réseau de capillaires lymphatiques qui couvre une grande partie du corps et assure le transport des fluides interstitiels et des cellules immunitaires (Fig.21A). Il est aussi composé d'organes primaires (thymus et moelle osseuse) qui permettent la production et la maturation des lymphocytes et d'organes secondaires (rate, appendis, ganglions, amygdales) responsables de la maturation des lymphocytes et de l'initiation de la réponse immunitaire. Les ganglions ont aussi en charge de filtrer le liquide interstitiel qui est absorbé par les plus petits capillaires. Le système lymphatique est

étroitement associé au système sanguin, notamment au niveau des ganglions où des échanges peuvent se faire avec les capillaires sanguins (Fig.21B) [257].

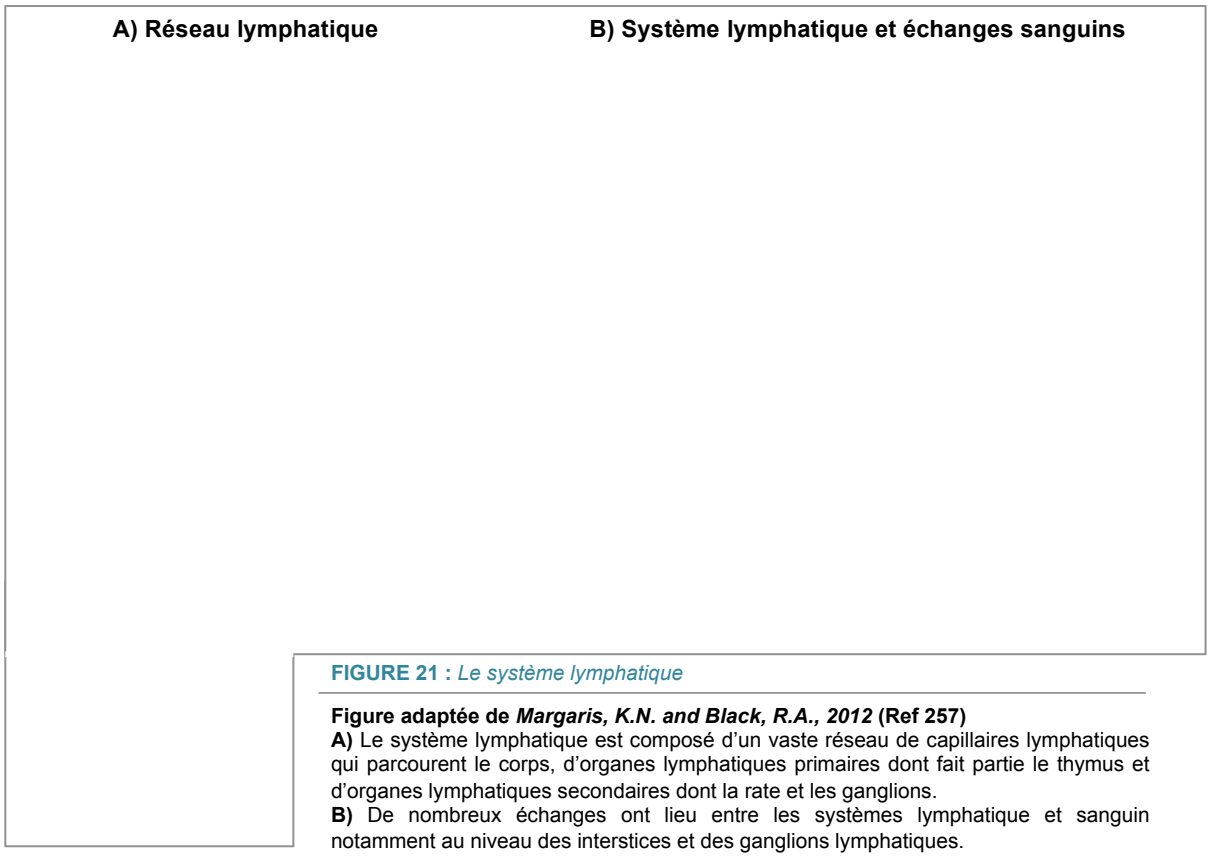


FIGURE 21 : *Le système lymphatique*

Figure adaptée de *Margaris, K.N. and Black, R.A., 2012* (Ref 257)
A) Le système lymphatique est composé d'un vaste réseau de capillaires lymphatiques qui parcourent le corps, d'organes lymphatiques primaires dont fait partie le thymus et d'organes lymphatiques secondaires dont la rate et les ganglions.
B) De nombreux échanges ont lieu entre les systèmes lymphatique et sanguin notamment au niveau des interstices et des ganglions lymphatiques.

Le centre germinatif : lieu de maturation des lymphocytes B

Les centres germinatifs sont des structures qui apparaissent dans les ganglions au cours de la réponse immunitaire. Suite à la reconnaissance d'un antigène, les lymphocytes B naïfs entrent dans un processus de prolifération et de maturation qui a lieu dans ces structures [258, 259]. Le centre germinatif est constitué d'une zone dite sombre où les lymphocytes B prolifèrent et subissent des hypermutations somatiques. Ces hypermutations touchent en particulier la région variable des immunoglobulines et permettent aux lymphocytes d'exprimer un récepteur antigénique (BCR) de haute affinité pour l'antigène. Les lymphocytes B sont ensuite sélectionnés par les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes helper $TCD4^+$ dans la zone dite claire. Ils sont alors la cible de nouvelles recombinaisons génétiques appelées commutation de classe. Puis, ils maturent en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes[2] et sortent du centre germinatif. Après leur interaction dans la zone claire avec les cellules

[2] cellules sécrétrices d'anticorps

dendritiques ou les lymphocytes $CD4^+$, les lymphocytes B peuvent être également redirigés vers la zone sombre pour subir de nouveaux cycles de prolifération et d'hypermutation somatique, ou peuvent entrer en apoptose si leur BCR est de trop faible affinité pour l'antigène (Fig.22.A) [260].

Le centre germinatif : lieu de naissance des lymphomes non Hodgkiniens

- Le centre germinatif : lieu d'accumulation de mutations

Le centre germinatif est le lieu de maturation des lymphocytes B mais est aussi le siège d'apparition des lymphomes B non Hodgkinien, et en particulier du lymphome diffus à grandes cellules B, du lymphome de Burkitt et du lymphome folliculaire (Fig.22.B) [261]. Les processus de développement des lymphocytes B du centre germinatif sont contrôlés par l'expression de nombreux facteurs qui sont dérégulés dans le cadre de ces lymphomes (Fig.22.A). Deux mécanismes sont en jeu : d'abord des hypermutations somatiques aberrantes peuvent avoir lieu et affecter l'état d'activation d'un de ces facteurs. Ensuite, des recombinaisons génétiques peuvent aboutir à des translocation chromosomiques malencontreuses qui vont résulter en la juxtaposition d'oncogènes avec des sites régulateurs de l'expression des immunoglobulines rendant l'expression de l'oncogène constitutive [262, 263].

- BCL6

BCL6 (B Cell Lymphoma 6) est un répresseur de la transcription qui gouverne plusieurs processus nécessaires à la maturation des lymphocytes B dans le centre germinatif. En effet, il inhibe l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, les réponses dues au stress génotoxique, l'activation et la différenciation des lymphocytes B. Ainsi BCL6 rend possible les réarrangements génétiques qui ont lieu au sein du centre germinatif. Pour ces mêmes raisons l'expression de BCL6 doit être réprimée avant la sortie des lymphocytes B du centre germinatif. Plusieurs mécanismes ont en charge d'inhiber l'expression de BCL6. Dans la zone claire du centre germinatif, les lymphocytes B reconnaissent les antigènes présentés par les cellules dendritiques et les lymphocytes T $CD4^+$. Ceci a pour conséquences l'activation des récepteurs antigéniques qui conduit à la phosphorylation de BCL6 par les MAP kinases puis à sa dégradation [264]. La stimulation du BCR active également NF-κB qui induit l'expression d'un répresseur de la transcription de BCL6, IRF4 [265]. Il a également était montré que le complexe SCF

associé à la F-Box FBOX11 assure l'ubiquitination de BCL6 qui est ensuite dégradé par le protéasome [266]. Enfin, BCL6 peut également inhiber sa propre expression [267]. L'expression anormale de BCL6 est associée au développement du lymphome diffus à grandes cellules B et peut être la conséquence de plusieurs aberrations génétiques [268]. Des mutations génétiques dans les régions régulatrices du gène bcl6 peuvent aboutir à l'impossibilité de réprimer son expression [267]. FBOX11 peut aussi être la cible de mutations le rendant non fonctionnel pour induire le dégradation de BCL6 [266]. Enfin le gène codant pour BCL6 peut être mis sous contrôle d'un promoteur de substitution par des translocations chromosomiques rendant son expression constitutive [269]. En outre, les souris transgéniques surexprimant BCL6 dans les lymphocytes B développent des lymphomes diffus à grandes cellules B, prouvant le caractère oncogènique de BCL6 [270, 271].

- Myc

Myc est un facteur de transcription connu pour son implication dans la prolifération cellulaire notamment en régulant le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et le métabolisme des cellules [272]. Cependant sa fonction au sein du centre germinatif reste largement inconnue. Myc est exprimé par les cellules B de la zone sombre. Il est ensuite réprimé par BCL6 et ne s'exprime plus dans la zone claire. Il est ré-exprimé de façon transitoire par les lymphocytes B qui sont redirigés dans la zone sombre. En outre, Myc semble être indispensable pour l'architecture du centre germinatif car les souris qui expriment un antagoniste de Myc sous le contrôle de la doxycycline ont des centres germinatifs de plus petites tailles que les souris contrôles après leur immunisation [273]. Myc est un oncogène et son expression constitutive induite par des translocations chromosomiques est fréquemment retrouvée dans le lymphome de Burkitt [274, 275].

- MEF2B

MEF2B (Myocyte-specific Enhancer Factor 2B) est un facteur de transcription exprimé par les lymphocytes B du centre germinatif. C'est un activateur de l'expression de BCL6 [263]. Le knockout de MEF2B et létale et des knockout conditionnels dans les lymphocytes B ont été générés. *In vivo,* les lymphocytes B MEF2B$^{-/-}$ ont des défauts de prolifération et de survie en réponse à la stimulation du BCR. De plus, ces souris présentent des centres germinatifs plus petits que les souris sauvages après leur

immunisation [276]. La dérégulation de MEF2 par l'accumulation de mutations somatiques entraine une activation constitutive de BCL6. Ce type de mutation est retrouvé dans un sous type de lymphome diffus à grandes cellules B (GCB DLBCL : "Germinal Center B cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma" ; cf chapitre III.1.C) [277].

- Les autres facteurs

Plusieurs autres facteurs impliqués dans la maturation des lymphocytes B ont été caractérisés. EZH2 est une méthyl transférase impliquée dans la répression de la transcription en méthylant l'histone 3 sur son résidu lysine K27. EZH2 est exprimé par les lymphocytes B uniquement dans le centre germinatif. Elle contrôle positivement la prolifération cellulaire en inhibant les points de contrôles du cycle cellulaire et régule négativement la différentiation des cellules B [278]. Des souris transgéniques exprimant EZH2 constitutivement activé dans leur lymphocytes B sont prédisposées à l'apparition d'un sous type de lymphome diffus à grandes cellules B (GCB DLBCL cf chapitre III.1.C) prouvant son caractère oncogénique [278, 279].

E2A est un facteur de transcription exprimé dans la zone sombre, il promeut la prolifération cellulaire en induisant l'expression de la cycline D3. La dérégulation de son expression est associée au lymphome de Burkitt [280, 281].

Enfin, IRF4, BLIMP1 et XBP1 sont exprimés par les lymphocytes B de la zone claire et permettent leur différentiation en plasmocytes. IRF4 et BLIMP1 répriment le programme transcriptionnel des lymphocytes B en inhibant l'expression de BCL6 [282, 283] alors que XBP1 est impliqué dans l'activation du programme de transcription des plasmocytes [284]. D'ailleurs IRF4 et BLIMP1 sont associés aux processus oncogéniques d'un sous type de lymphome diffus à grandes cellules B (ABC DLBCL : "Activated B Cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma" ; cf III.1.C) [285, 286].

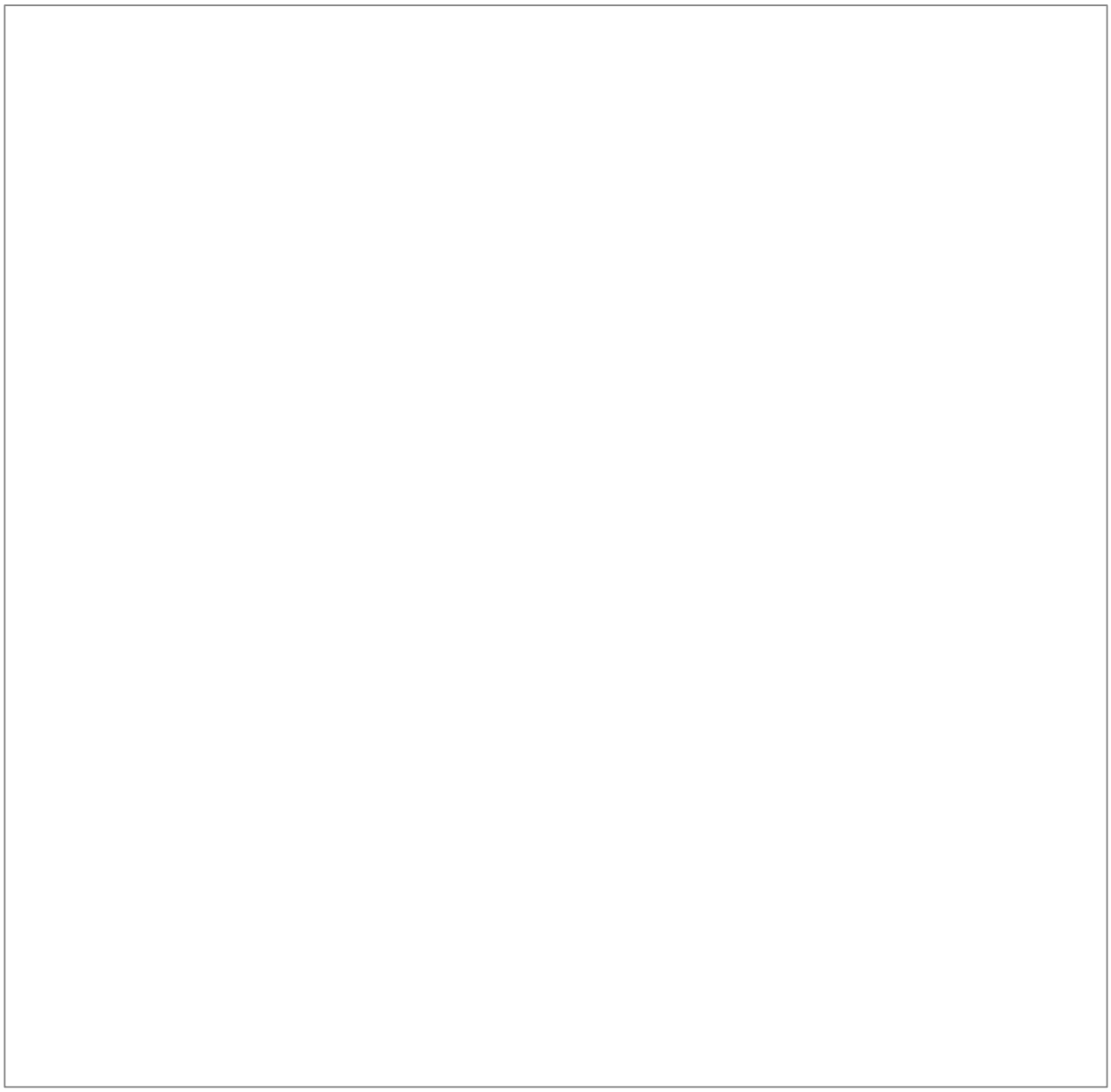


FIGURE 22 : *Maturation des lymphocytes B dans le centre germinatif*

Figure issue de Basso, C. et al., 2015 (Ref 262)

A) Les différentes étapes de maturation d'un lymphocyte B
Après la reconnaissance d'un antigène, le lymphocyte B naïf migre dans le centre germinatif. Il y subit des hypermutations somatiques (dans la zone sombre) et des recombinaisons isotypiques (dans la zone claire). Ces mécanismes génétiques vont permettre aux lymphocytes de produire des anticorps de haute affinité pour l'antigène et d'isotypes différents.
Au niveau de la zone claire, le lymphocyte B est en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et lymphocytes TCD4$^+$). Le lymphocyte B peut alors être redirigé vers la zone sombre ou entrer en apoptose si son BCR n'est pas suffisamment affin pour l'antigène. Si le BCR a suffisamment d'affinité pour l'antigène, le lymphocyte B se différencie en cellule mémoire ou en cellule sécrétrice d'anticorps (plasmocyte) et sort du centre germinatif.
L'ensemble de ces processus sont régulés par l'expression de nombreux facteurs. BCL6, Myc, MEF2B, E2A et IRF4 sont exprimés pendant la phase d'initiation. BCL6, MEF2B, E2H2 et 2A sont exprimés dans la zone sombre. BCL6, MEF2B et E2H2 sont également exprimés dans la zone claire. Myc est transitoirement exprimé par les lymphocytes B qui retournent dans la zone sombre. IRF4, BLIMP1 et XBP1 sont exprimés par les lymphocytes B de la zone claire mais aussi par les plasmocytes.
B) Le centre germinatif : lieu d'apparition de lymphomes
La zone sombre du centre germinatif est le lieu d'apparition de lymphomes. Le lymphome de Burkitt, le lymphome folliculaire et le lymphome diffus à grandes cellules B GCB DLBCL naissent à partir des lymphocytes B de la zone claire. Le lymphome diffus à grandes cellules B ABC DLBCL apparaît à partir des lymphocytes B en cours de différentiation en plasmocytes.

III.1.C) Les différents sous types de lymphome diffus à grandes cellules B

Depuis les années 2000, les techniques de génotypage ont permis de diviser en quatre groupes différents le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL : "Diffuse Large B Cell Lymphoma") en fonction de son lieu de formation, sa réponse aux traitements mais surtout en fonction de son profil d'expression génétique.

Le sous-type ABC DLBCL

Le premier sous-type a une signature génétique similaire à celle des lymphocytes B activés par leur BCR. Ce sous-type est donc nommé "type activé" ou ABC DLBCL pour "Activated B Cell like DLBCL" [287]. Les ABC DLBCL se développent dans la zone claire du centre germinatif au moment de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Cependant la différenciation en plasmocyte n'est pas achevée lors de l'apparition du lymphome. Ce sous-type est caractérisé par deux points importants : NF-κB est constitutivement activé dans les lymphomes ABC DLBCL et BLIMP1 qui intervient dans la différenciation des plasmocytes est inactivé [288, 289].
C'est le sous type le plus agressif. Il est de mauvais pronostique puisque seulement 30% des patients traités survivent après ans (Fig.23) [290].

FIGURE 23 : *Courbe Kaplan Meier ; survie globale de patients atteints de PMBL, GCB DLBCL et ABC DLBCL après leur chimiothérapie*

Figure issue de *Rosenwald, A., et al., 2003 (Ref 295)*
Courbe de survie de patients atteints de PMBL (Primary Mediastinal B cell Lymphoma) GCB DLBCL (Germinal Center B cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma) et ABC DLBCL (Activated B Cell like Diffuse Large B Cell Lymphoma) après leur chimiothérapie.

Le sous-type GCB DLBCL

Le deuxième sous-type exprime lui les gènes caractéristiques des lymphocytes B situés dans la zone claire du centre germinatif. Ce sous-type est nommé "type centre germinatif" ou GCB DLBCL pour "Germinal Center B cell like DLBCL" [287]. Bien que le mécanisme oncogénique des GCB DLBCL est mal caractérisé, il a toute fois été montré que des mutations activatrices d'EZH2 affectent 20% des GCB DLBCL et pourraient promouvoir la prolifération du lymphome [291]. Plusieurs oncogènes sont également activés de façon aberrante dans les GCB DLBCL comme BCL6, BCL2 et Myc [292, 293]. Les voies de migrations cellulaires impliquées dans la sortie des lymphocytes B

matures du centre germinatif sont activées de façon anormale dans environ 30% des GCB DLBCL [294]. Le lymphome GCB DLBCL est de meilleur pronostique que le lymphome ABC DLBCL et environ 60% des patients atteins de GCB DLBCL survivent 5 ans après le traitement (Fig.23) [290].

Le sous-type PMBL

Alors que les sous-types ABC et GCB DLBCL touchent en majorité des personnes ayant plus de 60 ans, l'âge médian des personnes affectées par le troisième sous-type est de 30 ans. Ce groupe nommé lymphome mediastinal primitif à grandes cellules B ou PMBL ("Primary Mediastinal B cell Lymphoma") est cependant plus rare et de bien meilleur pronostique que les deux autres. Environ 64% des patients survivent 5 ans après le traitement (Fig.23) [295]. Les PMBL se développent à partir des lymphocytes B résidant dans le thymus, et dépendent de l'activation constitutive des voies NF-κB et JAK-STAT pour promouvoir leur survie et leur prolifération [296].

Le sous-type PCNSL

Le lymphome primitif du système nerveux central (PCNSL : "Primary Central Nervous System Lymphoma") constitue le quatrième groupe. Son profil d'expression génétique est très proche de celui des ABC DLBCL et dépend d'une activation constitutive de NF-κB [297-299]. C'est un lymphome extra-ganglionnaire rare qui touche moins de cinq personnes sur un million. Le pronostique vital est très mauvais avec une survie à cinq ans de 20% [300].

III.2) Dissection moléculaire du mécanisme oncogénique des ABC DLBCL

III.2.A) ABC DLBCL et mutations multiples

Les techniques de séquençage à haut débit ont permis d'étudier ces six dernières années le génome de plusieurs biopsies issues de patients atteints de DLBCL. Quatre grandes études ont permis le séquençage de 302 échantillons et l'identification de plus de 400 mutations différentes affectant divers parties du génome (exons, introns, séquences inter-géniques, séquences régulatrices...) et touchant une très grande diversité de gènes (Fig.24). Le séquençage à haut débit a aussi mis en évidence que les ABC DLBCL cumulent entre 10 et 30 mutations différentes dont certaines sont très

récurrentes. C'est le cas des mutations affectant les voies de signalisations NF-κB, PI3K, WNT, les voies de différenciation des lymphocytes B et de remodelage de la chromatine [289, 301-303]. Dans la partie suivante, nous allons voir comment certaines de ces mutations sont impliquées dans le processus oncogénique des ABC DLBCL.

FIGURE 24 : *Statistiques des différentes mutations affectant les DLBCL : nature des mutations, mécanismes cellulaires affectés (gène ontologie) et fréquences*

Figure issue de *Zhang, J., et al., 2013* (Ref 303)
Répartition des différentes mutations identifiées par le séquençage de 73 biopsies de patients atteints de DLBCL en fonction de leur nature (A) ou des mécanismes cellulaires impactés (B).

III.2.B) Activation constitutive de NF-κB

Mise en évidence de l'activation constitutive de NF-κB

En 2001, une analyse transcriptomique a révélé que les gènes contrôlés par NF-κB sont principalement surexprimés dans les ABC DLBCL. Ceci est corrélé avec une activation constitutive du complexe IKK et de NF-κB. Dans le but d'étudier l'importance de ce mécanisme oncogénique, IKKβ a été inactivé par la mutation dominante négative de deux sérines (S177 et S181). De la même manière, des points de mutations affectant les sérines S32 et S36 ont été introduites dans IκBα. La transduction dans des lignées humaines ABC DLBCL de ces formes non phosphorylabes d'IKKβ ou d'IκBα induit l'arrêt des cellules en phase G1 et conduit à leur apoptose [304]. L'inhibition d'IKK par des molécules chimiques conduit au même résultat [305], prouvant ainsi le rôle crucial de NF-κB pour la prolifération et la survie des ABC DLBCL. Depuis 2001, les différentes études de génotypage ont pu mettre en lumière les différentes mutations à l'origine de l'activation aberrante de NF-κB et leur implication dans la survie et le développement des lymphomes ABC DLBCL.

Activation oncogénique de CARMA1

Un crible par ARN interférence d'une banque de shRNA a permis d'identifier le rôle oncogénique de CARMA1 dans les ABC DLBCL. La réduction de son niveau d'expression est toxique dans des lignées d'ABC DLBCL mais pas dans les GCB DLBCL [306]. De plus le séquençage du gène card11 codant pour CARMA1 à partir d'ABC DLBCL de différents patients a démontré que l'exon codant pour le domaine coiled-coil de CARMA1 est muté dans 8% des cas. Les différentes mutations sont recensées dans la Figure 25. *In vitro* l'expression ectopique du domaine coiled-coil de CARMA1 arborant une de ces mutations suffit à activer NF-κB dans des cellules Jurkat déficientes pour CARMA1. De même, si la transfection de siRNA dirigés contre CARMA1 est toxique pour les ABC DLBCL, l'expression du domaine coiled-coil muté de CARMA1 permet de contrebalancer cette toxicité et de maintenir la survie des ABC DLBCL. Par contre, l'expression du domaine coiled-coil sauvage de CARMA1 ne permet pas ce phénomène [307].

D'un point de vue moléculaire, il a été montré que CARMA1 portant la mutation S243P dans son domaine coiled-coil forme des agrégats avec MALT1 et la forme phosphorylée d'IKKβ [307]. De plus, des études suggèrent que les mutants F123I et L225LI ont plus d'affinité pour BCL10 que la forme sauvage de CARMA1 [308]. Ainsi, le modèle proposé est le suivant : les mutations du domaine coiled-coil inhiberaient le repliement de CARMA1 sur lui même et empêcheraient ainsi son auto-inhibition (cf chapitre I.2.B). De cette façon, le complexe CBM anormalement formé aboutit à l'activation de NF-κB indépendamment de l'activation du BCR.

FIGURE 25 : *Mutations oncogéniques identifiées dans la région coiled-coil de CARMA1*

Figure issue de Lenz, G., et al., 2008 **(Ref 307)**
Différentes mutations affectant le domaine coiled-coil de CARMA1 ont été identifiées.

Activation oncogénique du BCR

Bien que CARMA1 ne soit pas muté dans la majorité des cas, les ABC DLBCL affichent tous une activation constitutive de NF-κB. Le fait que la réduction de l'expression de CARMA1 par ARN interférence reste toxique suggére un piratage en amont du complexe CBM [306, 307]. En accord, le génotypage de biopsies issues de patients a permis d'identifier des mutations affectant les tyrosines des motifs ITAM de CD79A et CD79B (cf chapitre I.2.A). Ces résidus sont normalement phosphorylés par la kinase Lyn dans une boucle de rétro-contrôle négatif affin de contenir l'activation du BCR [97]. Les mutations de ces tyrosines retrouvées dans 23% des ABC DLBCL et sont à l'origine de l'activation constitutive du BCR (Fig. 26) [309]. Cette hypothèse est supportée par l'observation que les souris knockout pour le gène codant Lyn développent des problèmes auto-immuns dus à une activité incontrôlée des lymphocytes B [310]. En plus de réduire l'activation du BCR, la phosphorylation des motifs ITAM par Lyn permet l'internalisation du récepteur [311]. Les mutations retrouvées dans CD79A et CD79B compromettent l'internalisation du BCR et augmentent donc son expression à la surface des cellules. En outre, la réduction de l'expression des composants du BCR (IgH, IgL, CD79A et CD79B) ainsi que des effecteurs impliqués en aval de l'activation du BCR (BTK, SYK, PLCγ2, PI3K, PKCβ) est toxique pour les lignées d'ABC DLBCL arborant des mutations dans leur récepteur antigénique. De même, l'inhibition pharmacologique de BTK est spécifiquement toxique pour ces lignées [309]. L'importance du BCR dans la survie des lymphocytes B est aussi supportée par le fait qu'*in vivo* les lymphocytes B matures des souris n'exprimant pas l'un des composant du BCR meurent très rapidement [312, 313]. Enfin, l'engagement du BCR active de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire comme NF-κB, mais aussi la voie PI3K/AKT/mTOR bien connue pour son implication dans le développement de nombreux cancer [314].

FIGURE 26 : *Mutations oncogéniques identifiées dans les motifs ITAM de CD79A et CD79B*

Figure issue de *Shaffer, A.L., et al., 2012* (Ref 344)
Différentes mutations affectant les domaines ITAM de CD79A et CD79B ont été identifiées. Ces mutations compromettent la phosphorylation des motifs ITAM par Lyn.

Activation oncogénique de A20

La déubiquitinylase A20 est inactivée par des mutations bi-alléliques dans 23% des lymphomes ABC DLBCL [289, 303]. A20 est impliquée dans le rétro-contrôle de NF-κB en réponse à l'activation des récepteurs antigéniques (cf chapitre II.2.D). Le caractère suppresseur de tumeur de A20 a été mis en évidence par le fait que l'expression ectopique de A20 sauvage dans les ABC DLBCL mutées dans le gène codant de A20 est toxique [285].

Activation oncogénique de MyD88

29% des ABC DLBCL arborent une mutation L269P affectant MyD88 [315]. Cette substitution se trouve dans un feuillet β et déstructure la conformation 3D de MyD88 pour conduire à une protéine constitutivement active. Ainsi, l'expression de MyD88 L269P dans la lignée de GCB DLBCL BJAB suffit pour activer NF-κB. Il convient de noter que d'autres mutations affectant MyD88 sont présentes dans 8% des ABC DLBCL mais sont communes à d'autres lymphomes B. MyD88 joue un rôle pivot dans l'activation de NF-κB, des MAP kinases et de l'interféron de type 1 en aval des TLRs. Pour ce faire, MyD88 forme un signalosome avec les kinases IRAK4 et IRAK1 appelé MyDosome [316]. La réduction de l'expression de MyD88, IRAK1 ou IRAK4 par ARN interférence, de même que l'inhibition pharmacologique de l'activité kinase d'IRAK1 sont toxiques pour les lignées ABC DLBCL mutés dans le gène codant MyD88 [315]. Toutefois, seule la réintroduction de MyD88 L269P mais pas celle de MyD88 sauvage restaure la survie aberrante de ces cellules, illustrant ainsi le pouvoir oncogénique de la mutation L269P [315].

III.2.C) Conséquences des mutations activatrices de NF-κB

Formation constitutive du complexe CBM

Un point important à souligner est que le complexe CBM est constitutivement formé dans les ABC DLBCL, soit à cause de mutations affectant CARMA1, soit en conséquence d'autres mutations. En outre, la réduction de l'expression un a un des membres du CBM est toxique pour les ABC DLBCL, montrant que la formation complète du CBM est requise pour la survie du lymphome [306].

Activation de la paracaspase MALT1

Si aucune mutation visant MALT1 n'a été identifiée dans les ABC DLBCL, son activité paracaspase est exacerbée et ses substrats (A20, BCL10, CYLD et RelB) sont constitutivement clivés [146, 317, 318]. L'inhibition de l'activité catalytique de MALT1 dans les ABC DLBCL avec du z-VRPR.fmk réduit l'affinité de NF-κB pour l'ADN et entraîne la relocalisation dans le cytoplasme de la sous unité c-Rel de NF-κB [317]. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-XL (dont l'expression est gouvernée par NF-κB), A1 et FLIP. Les sécrétions d'IL-6 et d'IL-10 sont également compromises [143, 144, 317, 318]. De manière générale, les inhibiteurs de MALT1 (z-VRPR.fmk, promazide hydrochloride, mepazine acetate, MI2) entraînent l'apoptose des ABC DLBCL *in vitro* [143, 144, 317, 318]. Comment l'activité catalytique de MALT1 contribue au processus oncogénique des ABC DLBCL n'est que partiellement compris. La mutation de la cystéine C464 du site catalytique et de la lysine K644 qui contrôle la mono-ubiquitination de MALT1 réduit l'activation de NF-κB et la sécrétion d'IL-2 en réponse à la stimulation du TCR dans des cellules Jurkat, et inhibe la prolifération des ABC DLBCL [176]. Cependant, la phosphorylation de l'inhibiteur de NF-κB, IκBα, demeure inchangée, suggérant que MALT1 n'agit pas directement sur l'axe IKK/NF-κB, mais en aval du facteur de transcription [176]. En accord avec ceci, le clivage de RelB par MALT1 entraîne sa dégradation et l'augmentation de l'affinité de RelA et de c-Rel pour l'ADN [146]. La surexpression de RelB diminue l'expression des gènes cibles de NF-κB et ordonne la mort des ABC DLBCL [146]. Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'activité catalytique exacerbée de MALT1 est indispensable pour la survie des ABC DLBCL.

Activation de STAT3

Les niveaux élevés d'IL-6 et d'IL-10 résultant de l'activation constitutive de NF-κB stimulent le facteur de transcription STAT3 par effet autocrine dans les ABC DLBCL [319]. STAT3 est ainsi surexprimé et suractivé dans les lymphomes ABC DLBLC en comparaison aux GCB DLBCL [319, 320]. Ce facteur de transcription contrôle normalement la prolifération et la survie des cellules en réponse à divers stimuli [321]. Dans le contexte des ABC DLBCL, son activation fait partie du processus oncogénique puisque la réduction de son expression par ARN interférence est toxique [319, 320].

Activation d'IRF4

IRF4 est un facteur de transcription qui régule la différentiation des lymphocytes B en plasmocytes [282]. Bien qu'il ne soit pas muté dans les ABC DLBCL, son expression est élevée car elle est sous le contrôle de NF-κB. De manière intéressante, il a été montré qu'IRF4 augmente l'expression de CARMA1. De plus, la réduction de l'expression d'IRF4 par ARN interférence, ou son inhibition pharmacologique induit la production d'interféron β qui exerce un effet toxique sur les ABC DLBCL [285].

III.2.D) Les autres mécanismes oncogéniques mis en jeu

Inactivation de BLIMP1

BLIMP1 est un facteur transcription impliqué dans l'étape finale de différentiation de lymphocytes B en plasmocytes (cf chapitre III.1.B). BLIMP1 contrôle ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et la répression des gènes induits par l'activation du BCR [322]. Les souris knockout pour le gène codant BLIMP1 dans les lymphocytes B sont propices au développement de lymphomes ABC DLBCL, révélant le pouvoir suppresseur de tumeur de BLIMP1. Chez l'Homme, BLIMP1 est inactivé selon différents mécanismes dans environ 50% des ABC DLBCL. Il s'agit le plus souvent de mutation, de délétion ou de translocations chromosomiques affectant directement le gène codant BLIMP1 [286, 288].

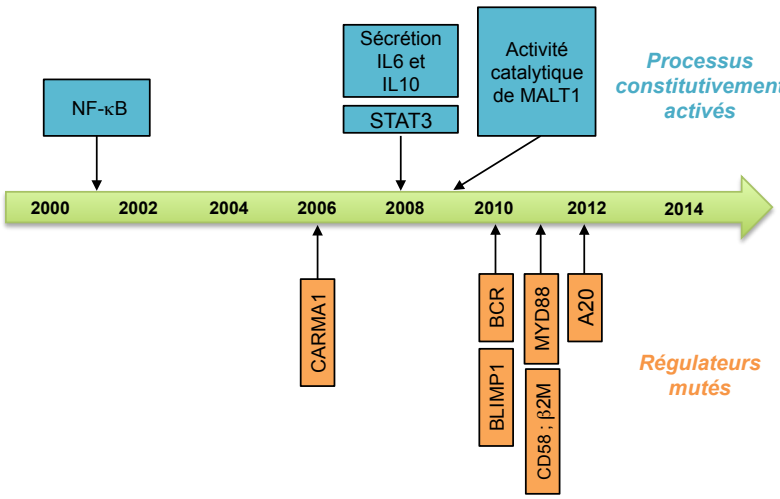
Echappement au système immunitaire

En plus de pirater les processus de développement cellulaire, les ABC DLBCL peuvent échapper au système immunitaire selon plusieurs mécanismes. Ainsi, 75% des DLBCL n'expriment pas à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH1), qui permet la reconnaissance des cellules par les lymphocytes T cytotoxiques. Des mutations affectant le gène de la β2-microglobuline qui compose le CMH1, ou un dysfonctionnement dans le trafic du CMH1 vers la membrane plasmique, diminuent son expression et permettent aux DLBCL de n'être ni reconnus, ni éliminés. En parallèle, la molécule CD58, qui assure la reconnaissance des cellules par les Natural Killer (cellules NK) est absente dans 68% des ABC DLBCL. Ces cellules ne peuvent donc pas être prises en charge par le système immunitaire [323].

En résumé, une combinaison de lésions génétiques permet aux ABC DLBCL de tirer avantage des processus impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Ces mutations peuvent affecter directement une voie de signalisation comme c'est le cas pour NF-κB et la voie PI3K/AKT/mTOR, ou indirectement via l'activité catalytique de MALT1, ou encore via IRF4 et STAT3, dont l'induction résulte de l'activité aberrante NF-κB. 8% des ABC DLBCL portent une mutation activatrice dans CARMA1, 37% dans MyD88, 23% dans CD79A/B, tandis que 23% présentent des mutations inactivatrices de A20. Au total, 91% des ABC DLBCL contiennent une ou plusieurs mutations à l'origine de l'activation de NF-κB (Fig. 27) [315]. Les 9% restants portent probablement des mutations qui touchent des régulateurs pas encore caractérisés de NF-κB.

FIGURE 27 : *Répartition des différentes mutations affectant NF-κB dans les ABC DLBCL*

Figure issue de *Roschewski, M., et al., 2014* (Ref 343)
Répartition des différentes mutations affectant NF-κB dans 155 ABC DLBCL. Certaines souches d'ABC DLBCL cumulent 2 à 3 mutations différentes.



Frise chronologique : Addiction oncogénique des ABC DLBCL

III.3) Quel traitement pour les ABC DLBCL?

III.3.A) Evolution des traitements de 1970 à aujourd'hui

Depuis les années 1970, les patients souffrant de DLBCL sont traités par des combinaisons de chimiothérapies [324]. En 1993, une étude rétrospective a comparé trois combinaisons de chimiothérapies différentes et couramment utilisées dans le traitement des lymphomes non Hodgkinien. Il apparaît que la combinaison Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone (traitement CHOP) offre les meilleurs taux de rémission pour les patients atteints de DLBCL. La Cyclophosphamide provoque des lésions de l'ADN en l'akylant, la Doxorubicine (Hydroxyadriamycin) est un intercalant de l'ADN, la Vincristine inhibe la polymérisation des microtubules. Ces trois composés empêchent ainsi la prolifération cellulaire. Enfin, le Prednisone est une hormone anti-inflammatoire. L'utilisation du traitement CHOP dans le cadre des DLBCL devient donc conventionnel en 1993 et il est parfois associé à de la radiothérapie [325, 326]. Depuis 1993, l'avancée majeur dans le traitement des DLBCL est le développement du Rituximab. Cet anticorps monoclonal cible le récepteur CD20 exprimé par les lymphocytes B matures et par 95% des lymphomes non Hodgkinien à cellules B, il facilite ainsi la déplétion des lymphocytes B en augmentant le recrutement des cellules Natural Killer et des macrophages [327].

III.3.B) Quelles sont les perspectives de traitements aujourd'hui?

Les chimiothérapies usuelles sont essentiellement des inhibiteurs de la prolifération cellulaire qui se basent sur le fait que les cellules tumorales croient plus rapidement que les cellules saines. Ces traitements s'avèrent donc peu spécifiques et s'accompagnent de multiples effets secondaires (immunodéficience, vomissements, perte des cheveux...). La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition des ABC DLBCL devrait permettre le développement de molécules ciblant plus spécifiquement ce lymphome tout en diminuant les effets secondaires. De nombreuses molécules font ainsi l'objet de tests cliniques (Tableau n°6). Ces composés ciblent les différentes voies de signalisation piratées par les ABC DLBCL (Fig. 28). Par exemple, des inhibiteurs du protéasome sont employés afin d'inhiber la dégradation d'IκBα et donc l'activation persistante de NF-κB [328, 329]. Cependant, leur faible

spécificité provoque des neuropathies. Le Lenalidomide inhibe IRF4 et est toxique pour les ABC DLBCL (cf chapitre III.2.C) [285]. Les tests en cours semblent toutefois montrer qu'il manque de spécificité. Deux inhibiteurs de la PKCβ ont montrés leur efficacité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffe. Ils sont spécifiquement toxiques pour les 23% d'ABC DLBCL portant des mutations dans le BCR [330-332]. Un inhibiteur de la βTRCP a prouvé son efficacité *in vitro* mais semble manquer de spécificité pour une utilisation chez l'Homme [333]. Les kinases associées au BCR SYK et BTK, ainsi que JAK1/2, qui agissent en aval des récepteurs à l'IL6 et l'IL10, sont ciblées par des molécules chimiques faisant l'objet de tests cliniques de phase II. Enfin, l'inhibition pharmacologique de l'activité catalytique de MALT1 est efficace *in vivo* dans des modèles de xénogreffe chez la souris [144]. Toutefois ces molécules n'ont pas encore été approuvées pour une utilisation dans le traitement du lymphome diffus à grandes cellules B.

FIGURE 28 : *Voies piratées par les ABC DLBC et les différents inhibiteurs développés*

Figure adaptée de *Shaffer, A.L., et al., 2012* (Ref 344)
Plusieurs mutations à l'origine de la survie et de la prolifération des ABC DLBCL ont été identifiées. Les mutations dans le BCR conduisent à l'activation des voies NF-κB et AKT/mTOR ; les mutations de CARMA1, A20 et MyD88 induisent l'activation constitutive de NF-κB. La sécrétion d'IL-6 et IL-10 conduit à l'activation de STAT3.
Différentes molécules ont été développées pour inhiber ces voies de signalisation. R406 inhibe SYK. L'ibrutinib inhibe BTK. Le Bortezomib et Carfizomib affectent NF-κB en inhibant le protéasome. Le Ruxolitinib et Pacritinib inhibent JAK1. Des inhibiteurs de l'activité paracaspase de MALT1 et de l'activité kinase d'IRAK4 ont été développés mais pas encore testés en clinique.

Tableau 6 : *Les inhibiteurs récemment développés dans le traitement des ABC DLBCL*

molécules	cible et mode d'action	essai clinique	Remarques	références
Bortezomib	Inhibe le protéasome empêche la dégradation d'IκBα	phase II achevée en 2011	provoque des neuropathies	[328, 329,334]
Carfilzomib	Inhibe le protéasome empêche la dégradation d'IκBα	phase I achevée en 2014		[335]
Lenolamid	Inhibiteur d'IRF4	phase II/III en cours	- ne semble pas être très spécifique de sa cible - ne fonctionne que pour les ABC DLBCL avec des mutation affectant MYD88	[285, 336, 337]
Ibrutinib	Inhibiteur de BTK	phase III en cours	ne fonctionne que pour les ABC DLBCL avec une mutation affectant le BCR	[308,338]
Enzastaurin **Sotrastaurin**	Inhibiteurs de PKCβ	- Enzastaurin testé *in vitro* - Sotrastaurin testé *in vivo* (souris)	ne fonctionne que pour les ABC DLBCL avec une mutation affectant le BCR	[330,332] [332,339]
R406	Inhibiteur de SYK	phase II	ne semble pas être très spécifique de sa cible	[340]
Ruxolitinib **Pacritinib**	Inhibiteurs de JAK2	Ruxolitinib testé en phase II	signe de toxicité gastrointestinale	[341] [342]
- Promazide hydrochloride **- Mépazine acetate**	Inhibiteurs de l'activité catalytique de MALT1	testé *in vivo* (souris)		[144]

IV) Objectifs de la thèse et stratégies

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL, Diffuse large B-cell lymphoma) représentent 30 à 40% des nouveaux cas de lymphomes non hodgkiniens diagnostiqués chaque année. Parmi les différentes entités qui composent les DLBCL, le sous-groupe ABC (Activated B cell-like) s'avère cliniquement le plus agressif et les taux de survie des patients recevant une chimiothérapie demeurent insatisfaisants [343]. Les lymphomes ABC DLBCL se distinguent par une signature génique similaire à celle des lymphocytes B activés par leurs récepteurs antigéniques [287]. Ceci se traduit par une activation constitutive du facteur de transcription NF-κB, pour lequel ils ont développé une profonde addiction [304]. Toutefois, les multiples processus physiologiques régulés par NF-κB rendent son ciblage thérapeutique *in vivo* impossible. La découverte que les lymphomes ABC DLBCL piratent un complexe contenant les protéines CARMA1, BCL10 et MALT1 (complexe CBM) normalement mis en place lors d'une réponse antigénique, pour maintenir NF-κB, survivre et se propager, a ouvert de nouvelles perspectives de traitement [306].

Les travaux développés au cours de cette thèse visaient à mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'activation de NF-κB au cours d'une réponse immune et dans des lymphomes ABC DBCL. La masse moléculaire du complexe CBM excède 1500 kDa [103] et caractériser sa composition exacte pourrait s'avérer une stratégie pertinente pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons réalisé un crible protéomique par spectrométrie de masse afin de définir l'interactome du CBM. Un accent particulier a été placé sur les facteurs qui régulent les processus d'ubiquitination réversible compte tenu du rôle crucial de ces modifications post-traductionnelles dans les différentes étapes de la transmission du signal NF-κB. Nous rapportons ainsi l'identification du complexe LUBAC comme un acteur clé de l'activation lymphocytaire et de la survie des lymphomes ABC DLBCL (voir section Résultats). En plus de cette approche protéomique, nous avons développé le crible d'une chimiothèque, regroupant des composés dont la toxicité et la biodisponibilité chez l'Homme est déjà connue, dans le contexte du lymphome ABC DLBCL. Cette stratégie nous a permis d'identifier une

molécule sélectivement toxique dans les ABC DLBCL qui pourrait s'avérer intéressante pour le développement de traitements cliniques (voir section Discussion).

RÉSULTATS

Résumé : Implication du complexe LUBAC dans l'activation lymphocytaire et la survie du lymphome ABC DLBCL

Le sous-groupe ABC (Activated B Cell-like) constitue l'entité la plus agressive des DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma). La survie et la prolifération des ABC DLBCL dépendent de l'activation constitutive de NF-κB, qui résulte de mutations somatiques dans les gènes CD79A/B, CARD11 (aussi appelé CARMA1), MyD88 et TNFAIP3 (A20) [344]. Bien que NF-κB émerge comme une cible thérapeutique attractive, sa nature pléiotrope rend son ciblage thérapeutique inenvisageable. De nouvelles perspectives de traitements restreint au compartiment lymphoïde sont apparues avec la découverte que les ABC DLBCL exploitent un complexe mult-protéique qui contient CARMA1, BCL10, MALT1 (complexe CBM) et CK1α, normalement mis en place lors d'une réponse antigénique [108, 306].

Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de NF-κB, nous avons réalisé un crible protéomique par spectrométrie de masse des partenaires de CK1α dans des lymphocytes en réponse à une stimulation antigénique. Deux peptides couvrant la séquence de l'E3 ligase HOIP (aussi appelé RNF31) ont ainsi été isolés. HOIP compose avec HOIL-1 (RBCK1) et SHARPIN un complexe ternaire appelé LUBAC (Linear Ubiquitin chain Assembly Complex) qui catalyse une poly-ubiquitylation de type linéaire, essentielle pour l'activation de NF-κB en réponse à des cytokines (TNFα, CD40L, IL-1β) ou à un stress génotoxique [206-208, 216]. Nos résultats indiquent que le LUBAC s'associe dynamiquement au CBM et gouverne l'activation optimale de NF-κB lors de la stimulation des récepteurs antigéniques. Fait important, cette fonction du LUBAC est indépendante de son activité catalytique. Dans des lignées issues de lymphomes ABC DLBCL, le LUBAC participe au complexe CBM constitutivement pré-assemblé en charge d'activer constamment NF-κB. L'élimination par ARN interférence du LUBAC dans ces lignées réduit l'activation aberrante de NF-κB et s'avère toxique. Ces travaux révèlent donc le LUBAC comme une cible thérapeutique potentielle dans les ABC DLBCL. L'ensemble de ces résultats est regroupé dans un manuscrit publié en avril 2014 dans *Blood [345]* et commenté par R. Beyaert [346] (Fig.29).

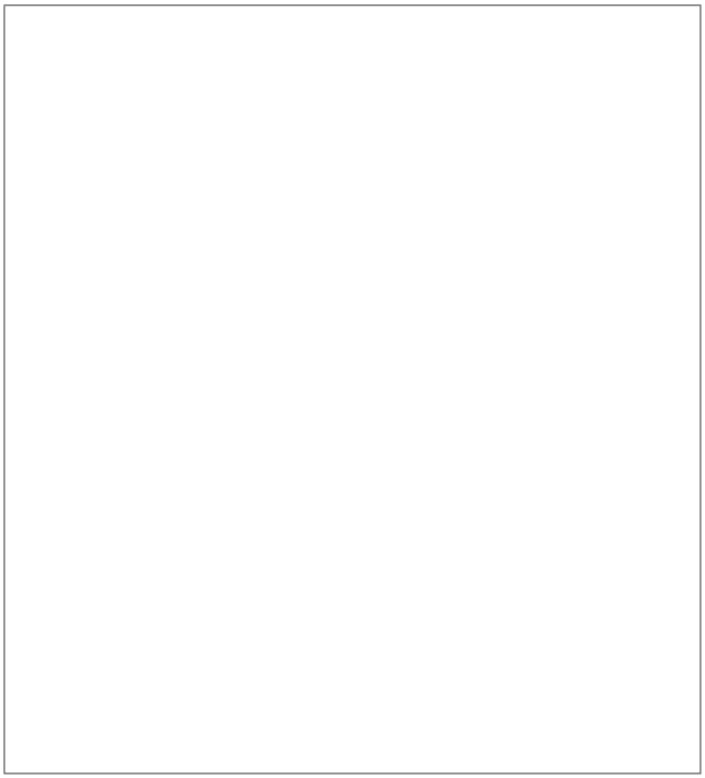


FIGURE 29 : *Implication du complexe LUBAC dans l'activation lymphocytaire et la lymphomagénèse*

Figure issue *de Beyaert, R. Blood. 2014* (Ref 346)

A Catalytic-Independant role for the LUBAC In NF-κB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells

blood
2014 123: 2199-2203
doi:10.1182/blood-2013-05-504019 originally published online February 4, 2014

A catalytic-independent role for the LUBAC in NF-κB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells

Sonia M. Dubois, Catherine Alexia, Youtong Wu, Héloïse M. Leclair, Claire Leveau, Emilie Schol, Thierry Fest, Karin Tarte, Zhijian J. Chen, Julie Gavard and Nicolas Bidère

Updated information and services can be found at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/14/2199.full.html

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
Brief Reports (1724 articles)
Lymphoid Neoplasia (1663 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on April 3, 2014. For personal use only.

Brief Report

LYMPHOID NEOPLASIA

A catalytic-independent role for the LUBAC in NF-κB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells

Sonia M. Dubois,[1-3] Catherine Alexia,[1-3] Youtong Wu,[4] Héloïse M. Leclair,[5-7] Claire Leveau,[1-3] Emilie Schol,[1-3] Thierry Fest,[8-11] Karin Tarte,[8-11] Zhijian J. Chen,[4] Julie Gavard,[5-7] and Nicolas Bidère[1-3]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; [2]Université Paris-Sud P11, Orsay, France; [3]Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France; [4]Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; [5]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France; [6]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1016, Paris, France; [7]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8104, Paris, France; [8]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche U917, Rennes, France; [9]Université Rennes 1, Rennes, France; [10]Etablissement Français du Sang, Bretagne, Rennes, France; and [11]Service ITeCH, Pôle de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France

Key Points

- LUBAC elements HOIP and SHARPIN participate in T-cell receptor-mediated NF-κB activation independently of HOIP catalytic activity.
- LUBAC silencing compromises constitutive NF-κB activation and cell survival in ABC DLBCL lines.

Antigen receptor-mediated nuclear factor κB (NF-κB) activation relies on the formation of a large multi-protein complex that contains CARMA1, BCL10, and MALT1 (CBM complex). This signalosome is pirated in the activated B-cell–like subgroup of diffuse large B-cell lymphoma (ABC DLBCL) to drive aberrant NF-κB activation, thereby promoting cell survival and propagation. Using an unbiased proteomic approach, we screened for additional components of the CBM in lymphocytes. We found that the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), which was previously linked to cytokine-mediated NF-κB activation, dynamically integrates the CBM and marshals NF-κB optimal activation following antigen receptor ligation independently of its catalytic activity. The LUBAC also participates in preassembled CBM complex in cells derived from ABC DLBCL. Silencing the LUBAC reduced NF-κB activation and was toxic in ABC DLBCL cell lines. Thus, our findings reveal a role for the LUBAC during lymphocyte activation and in B-cell malignancy. (*Blood*. 2014;123(14):2199-2203)

DISCUSSIONS

et

PERSPECTIVES

I) Rôle du LUBAC dans l'activation lymphocytaire et la lymphomagenèse

I.1) Contexte des travaux

L'activation du facteur de transcription NF-κB en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques repose sur la mise en place d'un large signalosome contenant notamment les protéines CARMA1, BCL10 et MALT1, appelé complexe CBM [347]. Fait important, ce complexe est également requis pour la propagation et la survie des lymphomes de type ABC DLBCL [306]. Avec 30% de survie à 5 ans, les traitements actuels contre les lymphomes ABC DLBCL demeurent insatisfaisant. D'ailleurs, des stratégies visant à cibler spécifiquement les mécanismes oncogéniques impliqués dans le développement des ABC DLBCL émergent depuis quelques années. Cependant, aucune molécule en cours de développement n'a pour le moment été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation dans le cadre du lymphome ABC DLBCL.

Le fait que le CBM affiche un poids moléculaire supérieur à 1500 kDa implique l'existence de multiples régulateurs en plus de CARMA1, BCL10 et MALT1 [103]. Notre stratégie visait à identifier de nouveaux partenaires du CBM dans la lignée lymphoblastoïde Jurkat par spectrométrie de masse afin de transférer nos découvertes dans le contexte des ABC DLBCL. La kinase CK1α, qui se lie à CARMA1 et autorise l'activation de NF-κB a été utilisée comme appât. CK1α assure également une boucle de rétrocontrôle négatif via son activité kinase et son expression est indispensable pour la survie des ABC DLBCL [108]. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux E3 ligases car les processus d'ubiquitination occupent une place prépondérante dans l'activation de NF-κB. [348]. D'ailleurs, l'identité de celles qui contrôlent l'ubiquitination de MALT1 et BCL10 reste trouble. Enfin, les E3 ligases présentent un intérêt thérapeutique certain pour deux raisons [349, 350]. D'une part, elles sont spécifiques d'un substrat. D'autre part, il a été prouvé qu'inhiber une activité E3 ligase, ou une interface E3 ligase/sustrat est possible grâce à des petites molécules. C'est le cas du

MLN4924 qui bloque l'activité E3 ligase du complexe SFC-βTRCP [349], ou des Nutlins, une familles de molécules qui interfèrent entre P53 et son E3 ligase HDM2 [350].

I.2) Le LUBAC : un nouveau partenaire du complexe CBM

Parmi les partenaires de CK1α se trouvait HOIP, une E3 ligase qui compose avec HOIL-1 et SHARPIN le complexe LUBAC en charge de catalyser l'ubiquitination linéaire [206-208]. Nous montrons que l'engagement des récepteurs antigéniques entraîne l'interaction dynamique du complexe LUBAC avec le CBM. Ce recrutement est séquentiel et le LUBAC n'est pas requis pour l'assemblage du CBM, ni pour l'ubiquitination de BCL10 ou de MALT1 [345]. Des travaux futurs devront élucider la nature des facteurs autorisant cette interaction. L'hypothèse que nous favorisons provient des travaux pionniers du groupe de Henning Walczak [226]. HOIP possède un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBA : "Ubiquitin Associated Domain") qui présente une forte affinité pour les chaînes d'ubiquitine K63 [226]. Il est donc tentant de spéculer que les poly-ubiquitinations K63 de BCL10 et de MALT1 permettent le recrutement du LUBAC. D'ailleurs, nos expériences d'immunoprécipitation de SHARPIN révèlent que le LUBAC est essentiellement lié aux formes ubiquitinilées de MALT1 [345]. Dans ce schéma, l'ubiquitination K63 d'adaptateurs clés pourrait servir de signal pour le recrutement du LUBAC en aval de divers immunorécepteurs.

I.3) Le LUBAC participe à l'activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques

I.3.A) Le LUBAC participe à l'activation optimale de NF-κB

Le LUBAC a été extensivement étudié dans le contexte de la réponse immunitaire innée. Ainsi, le LUBAC autorise l'activation de NF-κB en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα ou l'IL-1β, à la reconnaissance anti-virale et anti-bactérienne, ou suite à un stress génotoxique [206-208, 216, 351]. Nos travaux, associés à ceux de Yang et collègues, indiquent que c'est également le cas lors de l'engagement des récepteurs antigéniques [345, 352]. Seuls HOIP et SHARPIN, et non HOIL-1, semblent participer à l'activation optimale de NF-κB. Bien que le CBM se forme normalement en l'absence de HOIP, le complexe IKK n'est plus recruté au CBM et ni

activé. Nos données suggèrent que le LUBAC assure la connexion entre les complexes CBM et IKK et autorise ainsi l'activation d'IKK et de NF-κB [345].

I.1.B) L'activité catalytique de HOIP n'est pas requise

Le LUBAC catalyse des chaînes de polyubiquitine linéaires [206-208]. Toutefois, plusieurs éléments suggèrent que la participation du LUBAC à l'activation de NF-κB en réponse à l'engagement des récepteurs antigéniques est dissociable de son activité enzymatique. Tout d'abord, la réduction par ARN interférence des niveaux d'OTULIN, une déubiquitinylase du LUBAC [247, 248], n'altère pas l'activation de NF-κB par le TCR. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps spécifique des chaînes d'ubiquitine linéaires ne nous a pas permis de détecter la formation de ces chaînes dans des cellules stimulées par leur TCR. Ceci contrastait avec des cellules stimulées par du TNFα [209, 345]. Enfin, nous avons simultanément éliminé HOIP par ARN interférence et réintroduit HOIP sauvage ou HOIP inactivé dans son site catalytique par deux mutations affectant le domaine RBR. Nos résultats indiquent que l'activité catalytique de HOIP est requise pour l'activation de NF-κB en réponse à du TNFα, mais pas en réponse à la stimulation des récepteurs antigéniques [345]. En accord avec ces données, le groupe de Kazuhiro Iwai a généré des souris exprimant HOIP délété de son site catalytique dans les lymphocytes B uniquement. L'activation de NF-κB est compromise dans ces cellules en réponse à divers stimuli comme CD40 ou TNFα, mais pas en réponse à l'activation du BCR [223].

Collectivement, ces données suggèrent que le LUBAC contrôle l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation des récepteurs antigéniques indépendamment de sa capacité à générer des chaînes linéaires. D'autres protéines sont connues pour exercer des fonctions indépendamment de leur activité enzymatique. C'est le cas de la kinase Zap70 qui joue un rôle clé dans l'activation lymphocytaire. Si l'activité kinase de Zap70 est dispensable pour activer l'effet immuno-modulateur des lymphocytes T_{reg} après la stimulation de leur TCR, la fonction d'adaptateur de Zap70 est requise [353]. De la même manière, il a été mis en évidence qu'A20 interagit avec les chaînes d'ubiquitine linéaires conjuguées à NEMO afin de dissocier NEMO du complexe LUBAC. Par ce mécanisme, A20 inhibe l'activation de NF-κB en réponse au TNFα indépendamment de

son activité catalytique [235, 354]. HOIP pourrait donc jouer un rôle d'adaptateur et permettre la stabilisation de l'interaction entre les complexes IKK et CBM et ainsi autoriser l'activation du complexe IKK.

I.4) Le LUBAC : un casse tête dans l'activation lymphocytaire...

I.4.A) Mise en évidence d'un rôle ambivalent

Nos données dans des lignées lymphocytaires T et B suggèrent que le LUBAC contrôle l'activation du facteur de transcription NF-κB en réponse à la stimulation des récepteurs antigéniques [345]. Toutefois, la translation de ces résultats dans des lymphocytes T primaires humains issus du sang de donneurs sains s'est révélée être l'une des observations les plus surprenantes de ces trois années de thèse. Contre toute attente, réduire l'expression des membres du LUBAC par ARN interférence entraîne une activation partielle des lymphocytes T en l'absence de tout stimulus. Les cellules adoptent une morphologie blastique, prolifèrent et expriment à leur surface certains marqueurs d'activation tels que le récepteur de l'IL-2 (CD25) ou CD69. En réponse à une association d'anti-CD3 et anti-CD28, ce phénotype activé est exacerbé. En revanche, l'activation de NF-κB et la sécrétion d'IL-2 reste compromises (Fig.30 et 31B). Ces résultats suggèrent que le LUBAC exerce un rôle ambivalent lors de l'activation lymphocytaire. Cette fonction contre-intuitive du LUBAC trouve un écho particulier avec la caractérisation de patients déficients pour HOIL-1 [217]. Si les fibroblastes issus de ces patients affichent un défaut d'activation de NF-κB en réponse à de l'IL-1β ou du TNFα, leurs leucocytes présentent un phénotype intrigant. L'expression d'IFNγ et de certains membres de la famille du TNFα est réduite tandis que les niveaux de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-6R et l'IL-6ST sont anormalement élevés. La concentration plasmatique de certaines cytokines inflammatoires est également élevée chez ces patients par rapport à des sujets contrôles [217]. Ces travaux révèlent donc un rôle inhibiteur pour HOIL-1 sur la réponse immunitaire, associé à certains types cellulaires. En accord, les travaux initiaux sur HOIL-1 suggéraient que sa surexpression dans des cellules HEK293T inhibe l'activation de NF-κB en réponse à du TNFα ou de l'IL-1β. *A contrario*, la réduction de son expression par ARN interférence potentialise l'activation de NF-κB dans ces mêmes cellules [214]. Enfin, l'activité E3

ligase de HOIL-1 semble également requise pour réguler négativement l'activation de NF-κB lors de la reconnaissance anti-virale [351, 355].

La fonction exacte de HOIL-1 au cours de l'activation lymphocytaire demeure énigmatique. Nos résultats indiquent que HOIL-1 n'est pas requis pour l'activation de NF-κB dans les lignées cellulaires Jurkat et BJAB. En revanche, son absence dans des lymphocytes T primaires humains compromet la translocation nucléaire de NF-κB suite à la stimulation du TCR (Fig.31). Un bémol à ces observations réside dans le fait que la réduction d'un membre du LUBAC induit une diminution de l'expression des deux autres membres [206, 207]. Ainsi, réduire HOIL-1 altère l'expression de HOIP et de SHARPIN. A ce stade, nous ne pouvons donc pas exclure que l'inhibition de l'activation NF-κB en l'absence de HOIL-1 dans les lymphocytes T primaires humains ne résulte pas de la diminution de HOIP et SHARPIN. Il est également possible que la fonction de HOIL-1 sur NF-κB ne soit pas visible dans un modèle de lymphocytes T transformés tel que les Jurkat.

S'il nous semble essentiel, à l'avenir, de mieux appréhender les différentes facettes du LUBAC dans le contrôle de l'activation lymphocytaire, il n'est pas aberrent d'envisager HOIL-1 comme un inhibiteur de la réponse immunitaire adaptative. HOIL-1 pourrait réprimer certaines voies de signalisation menant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les lymphocytes, ainsi que dans d'autres types cellulaires comme les macrophages, les monocytes ou les cellules dendritiques. HOIL-1 pourrait également être important dans le contrôle de la maturation et de la différenciation des lymphocytes T primaires.

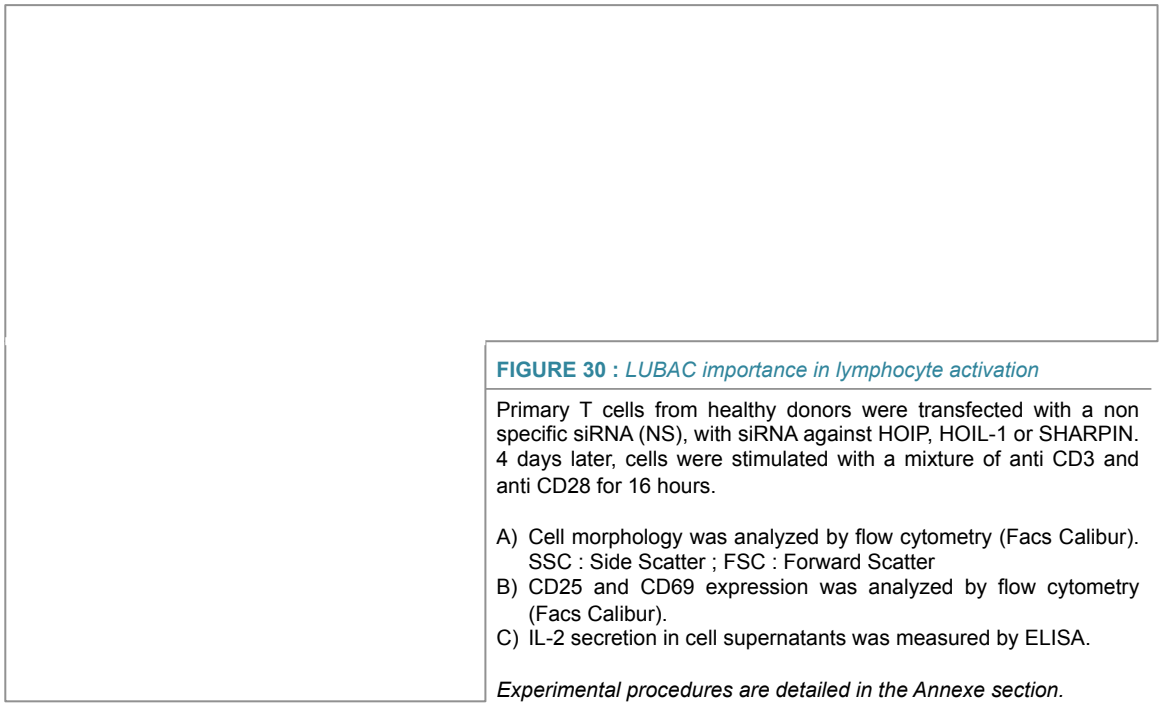


FIGURE 30 : *LUBAC importance in lymphocyte activation*

Primary T cells from healthy donors were transfected with a non specific siRNA (NS), with siRNA against HOIP, HOIL-1 or SHARPIN. 4 days later, cells were stimulated with a mixture of anti CD3 and anti CD28 for 16 hours.

A) Cell morphology was analyzed by flow cytometry (Facs Calibur). SSC : Side Scatter ; FSC : Forward Scatter
B) CD25 and CD69 expression was analyzed by flow cytometry (Facs Calibur).
C) IL-2 secretion in cell supernatants was measured by ELISA.

Experimental procedures are detailed in the Annexe section.

FIGURE 31 : *HOIL-1 participates in NF-κB nuclear translocation upon TCR stimulation*

Jurkat cells or primary T cells from healthy donors were transfected with a non specific siRNA (NS), with siRNA against HOIP or HOIL-1. 4 days later, cells were stimulated 1 hour with a mixture of anti CD3 and anti CD28 (CD3/28). p65 was stained in green and nuclei in blue. Cells were analyzed by confocal microscopy. Unst. unstimulated

Experimental procedures are detailed in the Annexe section

I.4.B) Un rôle différent selon le type cellulaire?

Plusieurs travaux tendent à démontrer que le rôle de HOIL-1 varie selon le type cellulaire. Les travaux portants sur les déficiences de HOIL-1 chez l'Homme établissent clairement que HOIL-1 a un rôle différent entre dans les leucocytes et les fibroblastes [217]. De même, HOIL-1 contrôle l'activation de NF-κB en réponse au TNFα dans les fibroblastes, mais pas dans les macrophages [356]. Dans ces mêmes macrophages,

HOIL-1 joue un rôle clé dans la formation et l'activation de l'inflammasome en réponse au LPS [356]. Il convient par ailleurs de noter que HOIL-1 exerce des fonctions qui dépassent le contexte immunitaire. Il a par exemple été proposé que HOIL-1 contribue au transport du fer par l'hème [211]. Surtout, les humains comme les souris déficients pour HOIL-1 souffrent d'amylopectinose[3], montrant un rôle de HOIL-1 dans la formation du glycogène par les cellules musculaires [215, 217].

SHARPIN semble également exercer des fonctions différentes en fonction des types cellulaires. Ainsi, SHARPIN est très abondante au niveau des régions post-synaptiques des neurones et un rôle dans les transmissions nerveuses a été avancé. Toutefois cette fonction n'a jamais été caractérisée en détail [357]. Enfin, dans des cellules de cancer de la prostate et dans les leucocytes primaires, SHARPIN interagit avec la sous unité β1 des intégrines et inhibe ainsi l'adhésion et la prolifération cellulaire [358].

Il est donc possible d'envisager que les membres du LUBAC aient des fonctions qui varient au sein même des différents types cellulaires qui composent le système immunitaire.

I.5) Le LUBAC participe à la survie des ABC DLBCL

Dans les ABC DLBCL, une combinaison de lésions génétiques pirate la voie d'activation de NF-κB mise en jeu en aval du récepteur antigénique. La formation aberrante du complexe CBM dans ces cellules est alors responsable de l'activation exacerbée de NF-κB, pour laquelle ces cellules ont développées une véritable addiction. Interférer avec l'activité du CBM ou d'IKK est ainsi toxique pour les ABC DLBCL [359]. Nos travaux, supportés par ceux de Yang *et al* [352], indiquent que le LUBAC participe activement à ce complexe CBM constitutivement formé afin de maintenir l'activation aberrante de NF-κB. Fait intéressant, les trois éléments du LUBAC contribuent ici à la survie des ABC DLBCL [345]. Ceci n'est pas sans rappeler la fonction type-cellulaire dépendante de HOIL-1 décrite ci-dessus.

Simultanément à la publication de nos travaux, Yang et collègues ont identifié deux polymorphismes de HOIP préférentiellement retrouvés dans les cellules de patients atteints d'ABC DLBCL (fréquence de 7,8% contre 1% chez les sujets sains). Ces

[3] dépôt de glycogène dans les cellules musculaires conduisant à une myopathie

polymorphismes correspondent à la conversion de la glutamine Q584 en histidine (Q584H) ou de la glutamine Q622 en leucine (Q622L). Ceci se traduit par une interaction plus forte entre HOIP et HOIL-1 qui aboutit à une activité catalytique du complexe LUBAC plus importante associée à une forte activation de NF-κB (Fig.32B et C). De plus, les auteurs caractérisent la présence de chaînes d'ubiquitine de type linéaire dans la lignée ABC DLBCL HBL1, suggérant l'implication de l'activité catalytique E3 ligase de HOIP (Fig. 32A) [352]. En accord avec ce principe, un peptide en hélice α a été généré pour perturber l'interface entre HOIP et HOIL-1 et est toxique pour les ABC DLBCL, renforçant l'idée que le LUBAC joue un rôle central pour la survie des ABC DLBCL [352].

FIGURE 32 : *Gain-of-function conferred by HOIP (RNF31) SNPs*

Figure from *Yang, Y., et al., 2014.* (Ref 352)

A) control or RNF31 shRNAs were inducibly expressed in HBL1 cells that had been transduced with rescue vectors expressing RNF31 isoforms or with an empty vector. Doxycycline (Dox)-induced cells were lysed in 1% SDS, diluted, and then subjected to immunoprecipitation with an anti-NEMO antibody, followed by immunoblotting for indicated proteins (top). The relative NEMO linear ubiquitination signal intensity was determined by densitometric analysis (bottom). Also shown are immunoblots for the indicated proteins in whole-cell lysates from the same cells.

B) HBL1 cells engineered to express indicated Myc epitope-tagged RNF31 isoforms were subject to anti-Myc immunoprecipitation

C) NF-**κ**B–driven luciferase reporter activity in HBL1 and TMD8 lines engineered to express the indicated Myc epitope-tagged RNF31 isoforms.

Les expériences futures devront déterminer l'origine de l'ubiquitination linéaire observée par Yang *et al*. En effet, la lignée HBL1 possède une mutation activatrice de MyD88 qui active NF-κB via l'assemblage de manière constitutive du MyDosome, un complexe notamment composé de MyD88, IRAK1 et IRAK4 qui se forme en réponse à la stimulation de certains TLRs [316]. D'ailleurs, la réduction des niveaux d'expression de MyD88, IRAK1 ou IRAK4 est toxique pour les ABC DLBCL arborant de telles mutations [315]. Or, le LUBAC catalyse l'ubiquitination de NEMO, de MyD88, d'IRAK1/4 et

participe à l'activation d'IKK puis de NF-κB en aval des TLRs [229]. L'absence d'ubiquitination linéaire après stimulation du TCR [345], combinée au fait que la signalisation du BCR se fasse indépendamment de l'activité catalytique de HOIP [223] suggère donc que l'ubiquitination linéaire observée dans la lignée HBL1 résulte du piratage du MyDosome, plutôt que de celui du CBM. Il sera toutefois essentiel de tester la contribution des membres du CBM et du MyDosome sur l'ubiquitination linéaire observée dans la lignée HBL1. D'autre part, il serait pertinent d'évaluer si les chaînes d'ubiquitine linéaires sont présentes dans des lignées d'ABC DLBCL dépourvues de mutations sur MyD88.

I.6) Le LUBAC comme une cible thérapeutique dans le traitement des ABC DLBCL?

L'un des objectifs de ce travail de thèse visait à mieux caractériser la voie d'activation de NF-κB en aval des récepteurs antigéniques afin de proposer de nouvelles perspectives de traitement des ABC DLBCL. Nos travaux, combinés à ceux de l'équipe de Louis Staudt révèlent que bloquer le LUBAC pourrait ouvrir une brèche. Plus précisément, Yang *et al* démontrent à l'aide d'un petit peptide qu'il est possible d'inhiber l'interface entre HOIP et HOIL-1 [352]. Dans la même optique, une étude récente a identifié qu'une molécule issue d'un champignon appelée gliotoxine se fixe sur le domaine catalytique de HOIP et bloque son activité [360]. Il est donc possible d'inhiber l'activité du complexe LUBAC par des molécules. Toutefois, plusieurs éléments incitent à la prudence. Compte tenu de son rôle majeur dans plusieurs voies d'activation de NF-κB, cibler le LUBAC pourrait ne pas s'avérer plus spécifique que de cibler IKK. De plus, le phénotype des patients déficients pour HOIL-1 ou des souris cpdm (sharpin$^{-/-}$) suggèrent qu'une inhibition de ce complexe pourrait avoir des effets secondaires délétères pour l'organisme [215, 217, 225]. Les efforts futurs devront porter sur l'identification du mode d'interaction entre le LUBAC et le CBM, dans le but d'envisager une inhibition de l'interface entre les deux complexes. On peut d'ailleurs spéculer qu'une telle inhibition serait alors spécifique de l'activation de NF-κB par les récepteurs antigéniques et très probablement toxique pour les ABC DLBCL.

II) Identification de nouveaux partenaires du signalosome CBM-LUBAC

Les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'assemblage, l'activation et le démantèlement des complexes CBM et LUBAC restent largement méconnus. Par exemple, l'identité des E3 ligases responsables de l'ubiquitination de MALT1 et BCL10, les mécanismes contrôlant l'activité catalytique de MALT1 par mono-ubiquitination, la nature des interactions entre les complexes LUBAC et CBM ainsi que les mécanismes qui régulent cette liaison sont pour l'heure inconnus. Dans le but d'identifier de nouveaux éléments du signalosome CBM-LUBAC, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse des partenaires liés à SHARPIN dans des cellules Jurkat stimulées par leur TCR pendant 15 minutes. Sept partenaires communs entre CK1α et SHARPIN ont été identifiés. Afin de hiérarchiser les différents candidats, l'impact de la réduction de leur expression par ARN interférence a été testé sur l'activation de NF-κB par bioluminescence. Ceci nous a permis d'identifier la protéine à activité GTPase ARHGEF18 (Fig.33). Nos travaux futurs chercheront à déterminer sa fonction au sein du signalosome CBM-LUBAC dans un contexte physiologique et pathologique.

Le complexe CBM présente une masse moléculaire supérieur à 1500 kDa 20 minutes après la stimulation du récepteur antigénique [103]. Il serait intéressant d'étudier les variations de poids moléculaire des complexes CBM et LUBAC au cours du temps. Ceci permettrait ainsi d'évaluer la cinétique et la dynamique d'assemblage du méga-signalosome CBM-LUBAC. De la même manière, une analyse fine par spectrométrie de masse des partenaires liés aux complexes CBM et LUBAC à différents temps post-stimulation devrait identifier d'éventuelles interactions transitoires avec des acteurs qui pourraient avoir un rôle clé dans la régulation de la formation du signalosome CBM-LUBAC.

FIGURE 33 : *Identification of new CBM-LUBAC signalosome partners*

A) CK1α and SHARPIN were immunoprecipitated in Jurkat cells stimulated with PMA and Ionomycin for 15 minutes. Samples were analyzed by mass spectrometry. Schema represents the common hits between CK1α and SHARPIN. In green the hits already characterized and in red the interesting hits.

B) Jurkat cells were transfected with a non specific siRNA (NS), or with two individual siRNA sequences against ARGGEF18 (ARHGEF18.1; ARHGEF18.2). Three days later, cells were transfected with p-NF-κB-Luc reporter and pTKRL control plasmids for an additional 24 hours, prior stimulation with 0.5 $\mu g.ml^{-1}$ anti-CD3 and anti-CD28 (CD3/CD28), with PMA and Ionomycin (PI), or with 10 $ng.ml^{-1}$ TNFα for 6 hours.

Experimental procedures are described in the Annexe section.

III) Caractérisation d'un inhibiteur chimique de la survie des ABC DLBCL : le composé E

III.1) Du développement d'un principe actif à la mise sur le marché d'un médicament

III.1.A) Un processus long, onéreux et risqué

Deux grandes stratégies se dégagent pour découvrir un principe actif qui servira de base pour l'élaboration d'un médicament. L'une d'elles exploite des molécules naturelles. Elles présentent l'avantage d'être biologiquement actives, en très grand nombre et avec une grande diversité chimique. Elles proviennent le plus souvent des plantes mais peuvent être également issues d'animaux marins, d'insectes ou de micro-organismes. Les molécules naturelles sont d'ailleurs à l'origine de très nombreux médicaments comme l'aspirine ou le taxol qui est utilisé en chimiothérapie. Elles sont d'abord collectées puis des cribles sont réalisés pour identifier des sets de molécules d'intérêts. Le meilleur des candidats fait ensuite l'objet de modifications afin d'améliorer son activité [361]. La deuxième stratégie s'applique lorsque la cible est déjà connue. Des modélisations bio-informatiques permettent de prédire la structure chimique de la molécule qui potentiellement peut interagir avec cette cible. Cette molécule ainsi que des analogues sont synthétisés et testés *in vitro* puis *in vivo*. Cette technique dite de "drug design" a notamment permis de mettre au point la famille des Nutlins, des petites molécules de synthèse qui inhibent l'interaction entre P53 et son E3 ligase HDM2, et qui sont utilisées dans certaines thérapies anticancéreuses [350].

Lorsqu'une molécule d'intérêt a fait ses preuves *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs modèles animaux, des tests cliniques commencent chez l'Homme. La phase 1 permet d'évaluer la tolérance de la molécule, sa solubilité et son métabolisme dans l'organisme chez des sujets sains. La deuxième phase permet de rechercher la dose optimale chez un nombre restreint de sujets malades. Les phases trois et quatre sont de plus grande ampleur et permettent d'évaluer l'efficacité et la tolérance (Fig.34). A chaque étape, le projet peut-être abandonné si la molécule est jugée trop toxique, pas assez soluble etc... Ce processus est long, onéreux et risqué. Il faut compter en moyenne 12 années entre

la découverte d'une molécule et sa mise sur le marché, 1 milliard de dollar et un faible rendement puisque sur 10^6 molécules testées seulement une aboutira à une mise sur marché (Fig.34) [362].

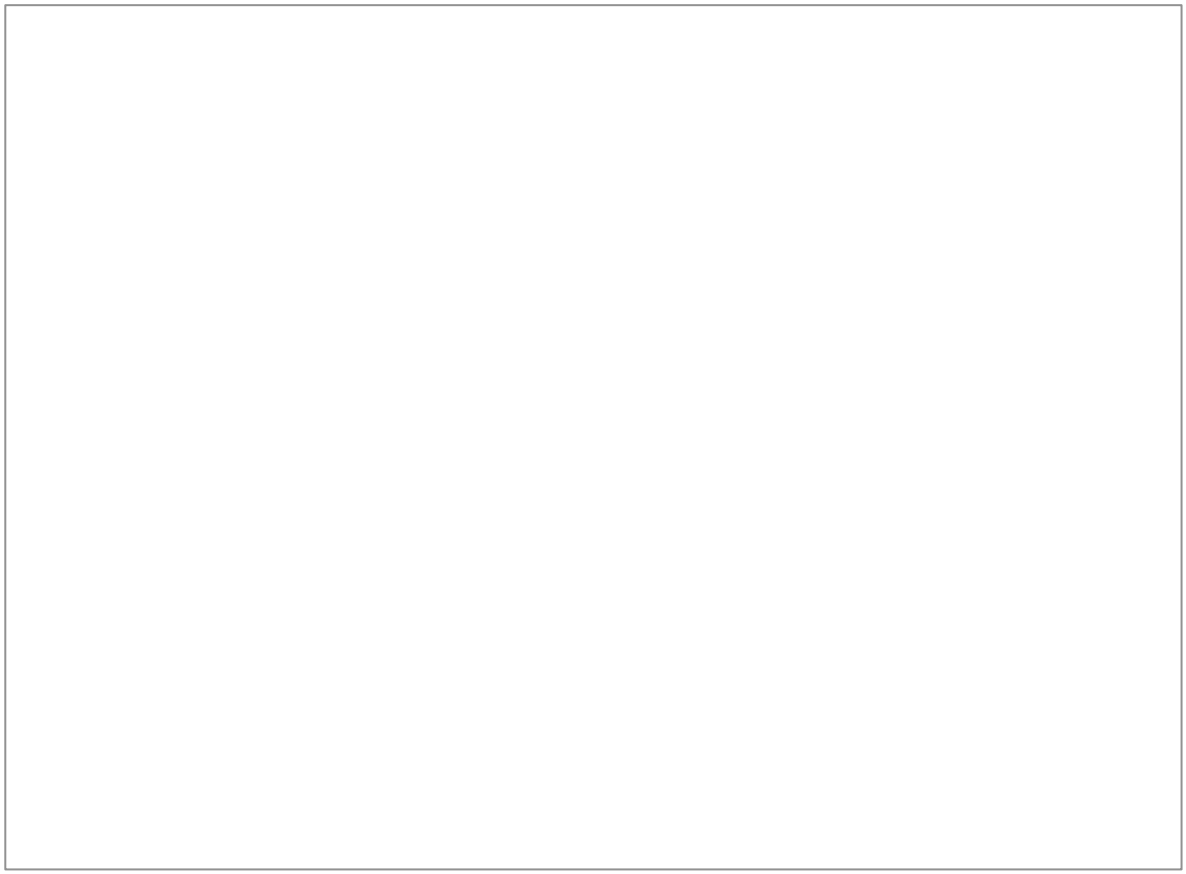


FIGURE 34 : *Le long périple de la découverte d'une molécule active à la mise sur le marché d'un médicament*

En moyenne sur 10^6 molécules qui sont testées initialement lors de tests *in vitro* seulement une donnera un médicament. Lorsqu'une molécule est active sur le test effectué *in vitro* elle et ensuite testée *in vivo* chez la souris. Des modifications chimiques peuvent-être apportées afin d'améliorer l'activité de la molécule, prévenir de sa dégradation trop rapide dans l'organisme… La toxicité du candidat est ensuite évaluée sur plusieurs espèces animales puis sur un petit groupe d'individus sains. Commence alors les phases cliniques 2, et 3 sur des individus malades afin de déterminer l'efficacité, les doses et le mode d'administration de la molécule. Le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est ensuite effectué. La phase 4 consiste en la surveillance des effets secondaires et de la tolérance du médicament à long terme après sa mise sur le marché. Lors de ce cheminement, la molécule peut-être abandonnée à toutes les étapes.

III.1.B) Vers une nouvelle stratégie : "le recyclage"

Le recyclage de molécules présente un grand intérêt car les paramètres pharmaco cinétiques de la molécule chez l'Homme sont déjà connus. En effet, la solubilité, la toxicité et la dose maximale tolérée ont déjà été évalués. Cette stratégie pourrait ainsi permettre de limiter le nombre d'échecs lors des essais cliniques en anticipant les effets secondaires mais aussi de donner une seconde vie à des molécules oubliées et qui ont couté des millions pour être autorisées sur le marché. C'est ainsi que le groupe de Daniel Krappmann a détourné des principes actifs de leur utilisation première dans le

cadre du lymphome ABC DLBCL. Un crible d'une chimiotèque de 18 000 composés déjà utilisés dans le cadre de diverses thérapies a permis d'identifier des inhibiteurs de l'activité catalytique de MALT1. La mépazine acétate et le promazine hydrochloride, deux molécules utilisées dans le traitement de démences, ont ainsi été identifiées comme inhibant MALT1 et sélectivement toxiques pour les ABC DLBCL *in vitro* et *in vivo* chez la souris [144]. En 2012 l'équipe de Louis Staudt a démontré que l'Ibrutinib[4] potentialise l'effet toxique du lenalidomide[5] sur des ABC DLBCL [285]. En 2013, son groupe a testé une librairie de molécules déjà connues pour leur pouvoir anti-cancéreux en combinaison avec l'Ibrutinib sur la viabilité des ABC DLBCL. L'idée est là d'identifier des effets synergiques entre des molécules afin de réduire leur dose active et de limiter les effets secondaires non spécifiques. Ceci a abouti à l'identification de candidats intéressants dont des inhibiteurs de la PI3 kinase ou de BCL2 [363].

III.2) Le repositionnement de molécules chimiques dans le cadre des ABC DLBCL

III.2.A) Identification du composé E comme un inhibiteur chimique de la survie des ABC DLBCL

Le traitement conventionnel pour les patients atteints d'ABC DLBCL consiste en l'association de chimiothérapie RCHOP[6] qui n'offre que 30% de guérison [343]. Ce traitement lourd se caractérise par de multiples effets secondaires comme des vomissements, une grande fatigue, la perte des cheveux... L'utilisation de l'association CHOP date des années 1970 et une seule découverte majeure, celle du Rituximab en 1993, a pu améliorer le destin des patients atteints d'ABC DLBCL [327]. Les molécules développées aujourd'hui ont soit des effets secondaires trop importants, comme les inhibiteurs d'IKK ou du protéasome, soit elles ne sont pas efficaces sur l'ensemble des ABC DLBCL. Par exemple, l'Ibrutinib ne fonctionne que pour les 23% des ABC DLBCL qui ont une mutation activatrice du BCR [343]. D'où la nécessité de développer de nouveaux traitements, plus spécifiques et plus efficaces.

Afin d'identifier de nouveaux régulateurs chimiques de la survie des ABC DLBCL, nous avons réalisé le crible d'une librairie de molécules approuvées par la FDA et utilisées

[4] Inhibiteur de la Burton Tyrosine Kinase (BTK)
[5] Inhibiteur d'IRF4
[6] RCHOP : Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone

pour divers traitements aux Etats-Unis. 1280 molécules ont été testées sur la viabilité de deux lignées de cellules ABC DLBCL selon un test colorimétrique mesurant l'activité métabolique des cellules. Les 276 composés toxiques ainsi identifiés ont ensuite été testés sur la survie de deux lignées de cellules GCB DLBCL, d'une lignée issue du lymphome à épanchement primaire (PEL : "Primary Effusion Lymphoma"), d'une lignée provenant de glioblastome (GBM : "Glioblastoma") et d'une lignée issue du cancer tête et cou (HN : "Head and Neck"). Seul, le composé E était toxique uniquement pour les lignées ABC DLBCL (Fig.35A et B). Le composé E est une molécule chimique utilisée aux Etats-Unis pour traiter les cancers de la prostate résistants aux traitements conventionnels. Son mécanisme d'action n'est pas bien caractérisé.

La toxicité sélective du composée E a été validée sur plusieurs lignées d'ABC DLBCL et GCB DLBCL selon différents tests. Nous montrons que le composé E diminue l'activité métabolique des cellules (Fig.35 C et D), ainsi que leur capacité à proliférer (Fig.35E) et entraîne leur mort (Fig.35 F). La préincubation des cellules avec un inhibiteur à large spectre des effecteurs de l'apoptose, les caspases, (Q-VD-OPh) prévient la mort des cellules (Fig.35G). Ainsi, le composé E inhibe l'activité métabolique et la prolifération des ABC DLBCL et induit leur apoptose. Ce phénomène est spécifique du sous-type ABC DLBCL puisque le composé n'a aucun effet sur la viabilité des cellules GCB DLBCL. Bien que les différentes lignées d'ABC DLBCL présentent des sensibilités différentes au composé E, leur mort apoptotique est observable dès 16 heures post-traitement.

III.2.B) Mode d'action du composé E

Impact du composé E sur NF-κB

L'axe CBM/IKK/NF-κB est constitutivement activé dans les cellules ABC DLBCL et son inhibition, tout comme le blocage de l'activité enzymatique de MALT1, entraîne la mort des cellules [306, 364]. Le profilage moléculaire des lignées dont nous disposons a révélé que toutes affichent une phosphorylation aberrante d'IκBα, associée à une translocation nucléaire constitutive de c-Rel et une activation de l'activité paracaspase de MALT1 (tableau 7). Contre toute attente, le composé E n'a qu'un effet minimal sur la translocation nucléaire des sous unités de NF-κB c-Rel et p65. De même, la dégradation d'IκBα reste inchangée (Fig.36A et B). En accord avec ces résultats, la sécrétion de cytokines sous le contrôle de NF-κB telles que l'IL-6 et l'IL-10 ne varie pas (Fig.36C). Enfin, le clivage constitutif des cibles de MALT1 (CYLD et Roquin1) n'est pas affecté par le composé E (Fig.36A). Ainsi, nos résultats suggèrent que le composé E n'influe pas sur l'activation aberrante de NF-κB ou sur l'activité catalytique de MALT1 dans les ABC DLBCL.

Tableau 7 : *Profil moléculaire des différentes lignées de DLBCL utilisées*

	OCI-Ly3	OCI-Ly10	RIVA	U2932	BJAB	OCI-Ly19
SOUS-TYPE						
ABC	✓	✓	✓	✓		
GCB					✓	✓
CYTOSOL						
IκBα			+		+	+
P-IκBα	+	+	+	+		
IκBβ			+	+	+++	+++
Lyn	+	+	+	+	+	+
P-Lyn	+		+			
P-AKT	+	+	+	++	+++	+
STAT3	+	++	+	+	+	
P-STAT3		+		+		
P-JNK	+	+				
NOYAU						
c-Rel	+	+	++	+		
p65	+	+	+			
C-JUN	+	+				+
C-FOS	+	+	+	+	++	+
ACTIVITE CATALYTIQUE DE MALT1						
cibles de MALT1 clivées	++	++	+	+		

Impacte du composé E sur NF-AT

Une analyse transcriptomique de cellules ABC DLBCL traitées 6 heures avec le composé E a révélé une induction de NF-AT (NF-AT, "Nuclear Factor for Activated T cells") et de gènes sous son contrôle. Bien que cinq protéines composent cette famille

de facteurs de transcription (NF-ATc2 ou NF-AT1 ; NF-ATc1 ou NF-AT2 ; NF-AT3 ; NF-AT4 et NF-AT5), seuls NF-AT1 et NF-AT2 sont exprimés dans les lymphocytes. NF-AT gouverne notamment la sécrétion de cytokines comme l'IL-2, le TNFα ou l'INFγ en réponse à la stimulation du TCR [365]. Il a été démontré que NF-AT peut-être régulé par sumoylation [366], mais il possède surtout 13 sites de phosphorylation qui permettent de moduler son activation [367]. La kinase de NF-AT, la calmoduline, est elle activée par l'efflux de calcium provoqué par la stimulation des récepteurs antigéniques [367]. Dans les lymphocytes T et B, il a également été montré qu'une activation aiguë du récepteur antigénique conduit à une augmentation rapide de l'expression de NF-ATc1 [367]. Biochimiquement, nous observons une activation de NF-ATc1 (NF-AT2) spécifiquement dans les ABC DLBCL traitées par le composé E (Fig.36D). De plus, le composé E induit des modifications post-traductionnelles de NF-ATc1. Ces modifications post-traductionnelles pourraient correspondre à des sumoylations ou des phosphorylations multiples. A ce stade de notre étude, l'impact de l'activation de NF-ATc1 sur la survie des ABC DLBCL reste énigmatique.

Le composé E induit la sécrétion de cytokines toxiques

En parallèle de l'activation de NF-ATc1, nous avons montré que le composé E induit la sécrétion de cytokines toxiques par les ABC DLBCL. En effet, un milieu conditionné préparé à partir de cellules ABC DLBCL traitées avec le composé E est toxique lorsqu'il est appliqué sur des GCB DLBCL pourtant insensibles au composé E lui même (Fig.36E et F). Il convient de noter que ce milieu conditionné n'active pas NF-ATc1 dans des cellules GCB DLBCL (Fig.36G). Ceci suggére que NF-AT pourrait induire la sécrétion de cytokines toxiques par les ABC DLBCL. Cependant, nous n'avons pas encore établi de lien direct entre l'activation de NF-AT et l'induction de l'apoptose. Nous projetons donc de générer des lignées de cellules ABC DLBCL exprimant de façon stable un shRNA dirigé contre NF-ATc1 ou NF-ATc2 afin de tester si la réduction de l'expression de NF-AT protège les cellules de l'apoptose induite par le composé E. Nos travaux futurs devront identifier les cytokines toxiques sécrétées par les ABC DLBCL. Différents tests ELISA nous permettent d'exclure le TNFα, TNFβ et Fas-ligand. Il serait intéressant de réaliser des tests de "protein-array" afin de les identifier. Ces résultats ne sont pas sans rappeler le lenalidomide, qui induit une augmentation de la sécrétion d'interféron β (IFNβ) par les ABC DLBCL et promeut leur mort apoptotique [285].

Notre hypothèse de travail propose que le composé E active NF-ATc1 dans les ABC DLBCL et déclenche ainsi la sécrétion de cytokines toxiques (Fig.36H). De nombreuses incompréhensions restent à élucider : comment NF-ATc1 est-il activé par le composé E? Pourquoi le facteur de transcription n'est activé que dans les ABC DLBCL? Enfin, quel est le lien entre NF-ATc1 et la sécrétion de cytokines toxiques?

III.2.C) Une coopération NF-κB/NF-AT peut-elle conduire à l'apoptose des ABC DLBCL?

Il a récemment été mis en évidence dans des lymphocytes B que l'activation du BCR conduit à une rapide (dès 30 minutes) expression de NF-ATc1 étroitement corrélée à l'activation de NF-κB puisque l'ablation de c-Rel abolit l'expression de NF-ATc1 [368]. Cependant, le rôle de cette collaboration reste inconnu. Il a toute fois été montré en 2011 que NF-AT contrôle l'expression de gènes pro-apoptotiques dans les lymphocytes B [369]. Nous avons réalisé une analyse bio-informatique afin d'identifier les promoteurs de gènes reconnus en même temps par NF-κB et NF-AT. Plus de 1000 gènes sont prédits par le logiciel genomatix pour être régulés par ces deux facteurs de transcriptions. Parmi ces gènes, de nombreux sont des régulateurs de l'apoptose ou de la survie cellulaire.

Il serait donc pertinent d'étudier le rôle d'une collaboration entre NF-κB et NF-AT dans un contexte physiologique, en s'intéressant notamment à l'impact de la modulation de l'activation de l'un et l'autre sur la balance apoptose/survie cellulaire. Comprendre comment NF-κB et NF-AT modulent cette balance pourrait avoir des retombées intéressantes dans le traitement des lymphomes ABC DLBCL.

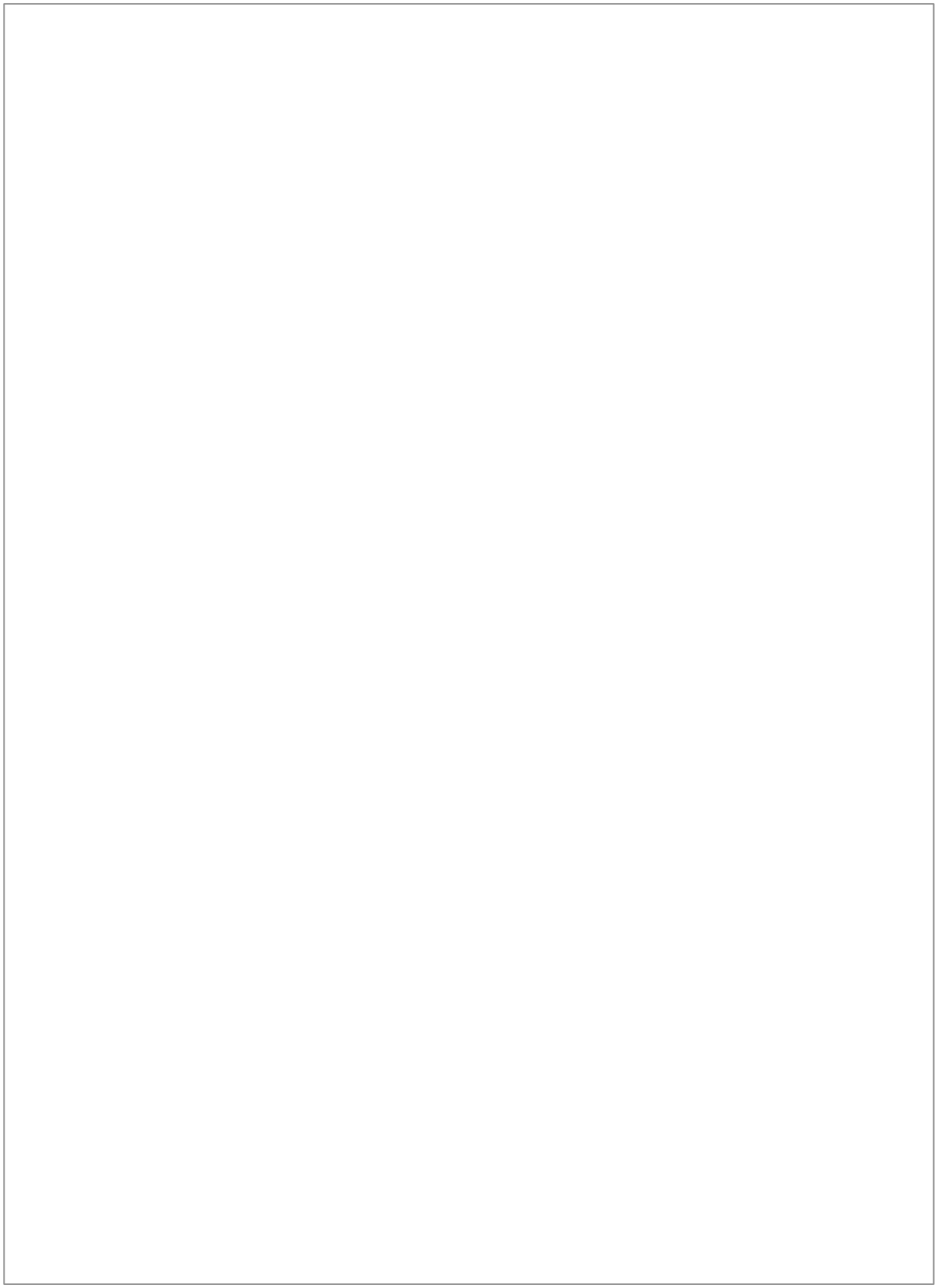


Figure 35 : *compound E (C.E) induces a caspase dependent apoptosis in ABC DLBCL lymphoma*

Figure legend in page 127

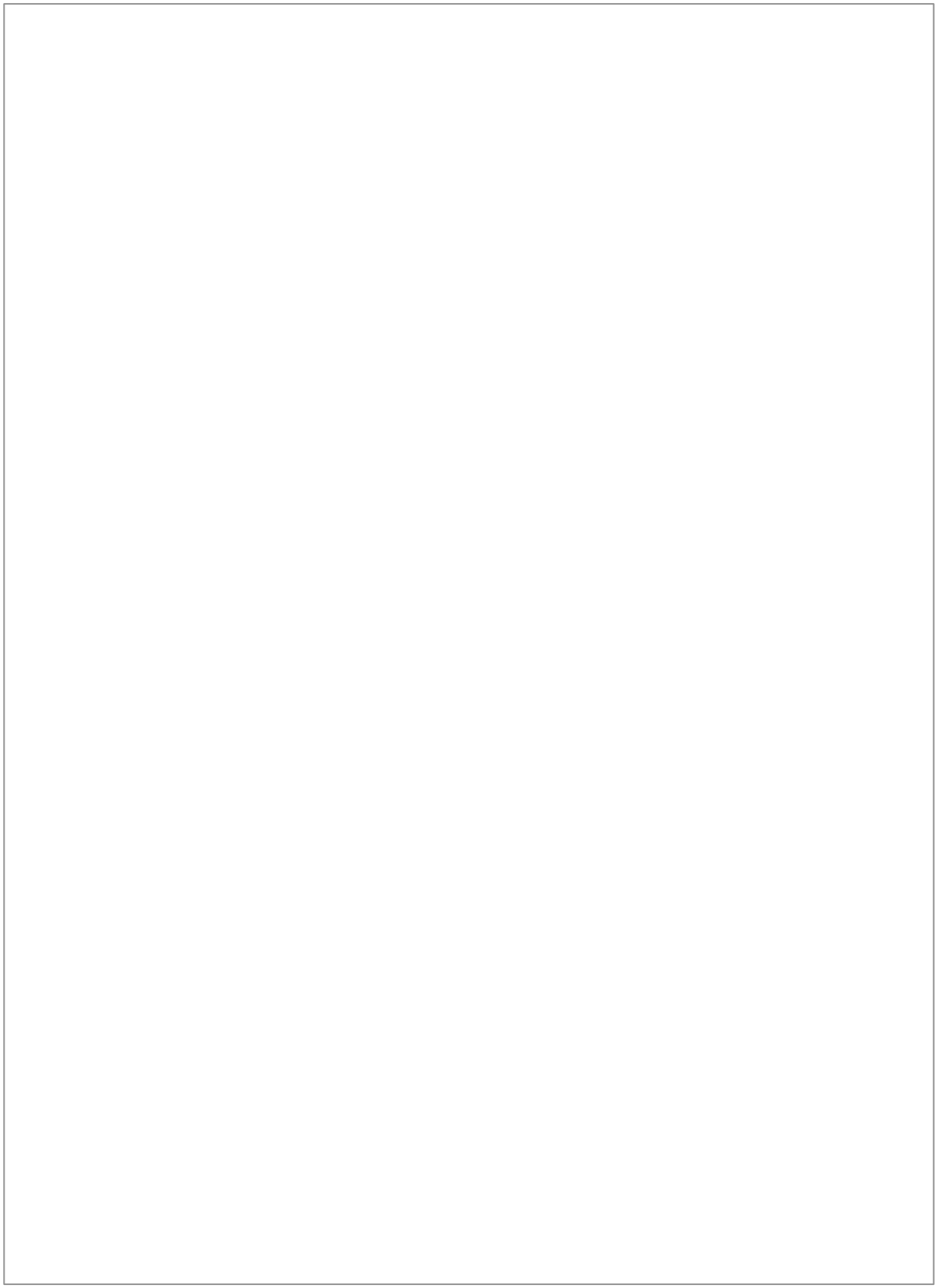


Figure 36 : *compound E (C.E) does not impact NF-κB signaling but induces NF-ATc1 activation and toxic cytokines secretion in ABC DLBCL*

Figure legend in page 127

Figure 35 : *compound E (C.E) is toxic for ABC DLBCL lymphoma by inducing a caspase dependent apoptosis*

A) Screen procedure. We identified 276 toxic molecules for ABC DLBCL, but only one was not toxic for other tested cell lines.

B) ABC DLBCL cell lines OCI-Ly3 and OCI-Ly10, GCB DLBCL cell lines OCI-Ly19 and BJAB, the primary effusion lymphoma (PEL) cell line BC1 and a cell line from Head and Neck cancer (HN) were treated with 10 μM of compound E (C.E). 48h later, viability was assessed using an uptiblue assay.

C) Cells were treated with the indicated dose of compound E or with DMSO for 72 hours. Cell viability was measured using uptiblue. Graph represents the fold compared to samples treated with DMSO.

D) Cells were treated with 8 μM of compound E, with DMSO, or with PBS1X for the indicated time. Cell viability was measured using uptiblue. Fold compared to samples treated with PBS1X is shown.

E) Cells were stained with CFSE before treatment with compound E at 10 μM. CFSE dilution was tracked over time by flow cytometry.

F) Cells were treated with 10 μM of compound E or with DMSO. 24 hours or 48 hours later, cells were stained with $DiOC_6$ plus Propidium Iodide and analyzed by flow cytometry.

G) ABC DLBCL cells were pre-treated with 50 μM of the caspase inhibitor Q-VD-OPh (QVD) or with DMSO before treatment with compound E at 10 μM for 48 hours. Cell were then stained with $DiOC_6$ and analyzed by flow cytometry.

experimental procedures are detailed in Annexe 1.

Figure 36 : *compound E (C.E) does not impact NF-κB signaling but induces NF-ATc1 activation and toxic cytokines secretion in ABC DLBCL*

A) ABC DLBCL cell lines U2932 and RIVA were treated with DMSO or with compound E at 1 or 10 μM. 16 hours later, nuclear and cytosolic fractions were purified and analyzed by immunoblot as indicated.

B) The ABC DLBCL cell line U2932 and the GCB DLBCL cell line BJAB were treated with DMSO or with compound E at 5 or 10 μM. Cells were analyzed as in A.

C) The ABC DLBCL cell line U2932 was treated with DMSO or compound E at 5 μM and the ABC DLBCL cell line SUDHL2 was treated with DMSO or compound E at 10 μM. 16 hours later, IL6 and IL10 concentrations in cell supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

D) The ABC DLBCL cell line U2932 and the GCB DLBCL cell line BJAB were treated and analyzed as in A.

E) Experimental procedure used in panel G and H. The ABC DLBCL U2932 and the GBC DLBCL cell line SUDHL4 were treated with DMSO or with 10 μM of compound E. After 24 hours, cell supernatants were collected (conditioned media) and applied onto SUDHL4 cells. Conditioned media impact on SUDHL4 was analyzed in G and H.

F) SUDHL4 treated as indicated in E were stained with $DiOC_6$ and analyzed by flow cytometry.

G) Nuclear and cytosolic fractions were extracted from SUDHL4 stimulated with PMA plus ionomycin or treated as indicated in F and analyzed by immunoblot.

experimental procedures are detailed in Annexe 1.

H) C.E induces NF-AT activation and the secretion of toxic cytokines by ABC DLBCL.

IV) Le mot de la fin

Durant ces trois années de thèse j'ai pu caractériser le complexe LUBAC comme un nouveau partenaire du complexe CBM. Notamment le LUBAC permet le recrutement et l'activation du complexe IKK au niveau du CBM, indépendamment de HOIL-1 et de l'activité catalytique de HOIP. HOIP jouerait donc le rôle d'adaptateur dans ce contexte. Le complexe LUBAC participe au CBM formé de façon aberrante ainsi qu'à l'activation constitutive de NF-κB dans les ABC DLBCL. De plus le LUBAC est crucial pour la survie des ABC DLBCL. Ainsi, caractériser la nature de l'interaction entre les complexes CBM et LUBAC devient un enjeu important, puisqu'inhiber cette interaction par une molécule pourrait être toxique pour les ABC DLBCL. En ce sens, j'ai pu identifier un nouveau partenaire du signalosome CBM-LUBAC, ARHGEF18. Cependant sa caractérisation reste à faire.

J'ai également mis en évidence un rôle ambigu de HOIL-1 dans l'activation lymphocytaire. Bien que cette fonction reste à préciser, plusieurs études laissent penser que HOIL-1 pourrait être un inhibiteur de certaines voies de différenciation lymphocytaire.

Enfin, j'ai pu identifier le composé E comme une molécule spécifiquement toxique pour les ABC DLBCL. Ce composé induit une activation de NF-AT mais aussi la sécrétion de cytokines toxiques. Si ces cytokines n'ont pas la capacité d'activer NF-AT, le lien entre NF-AT et leur sécrétion reste à établir. De plus des prédictions bio-informatiques laissent penser que NF-AT et NF-κB pourraient coopérer dans le contrôle de la balance apoptose/survie cellulaire, ouvrant la porte à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre des ABC DLBCL (Fig.37).

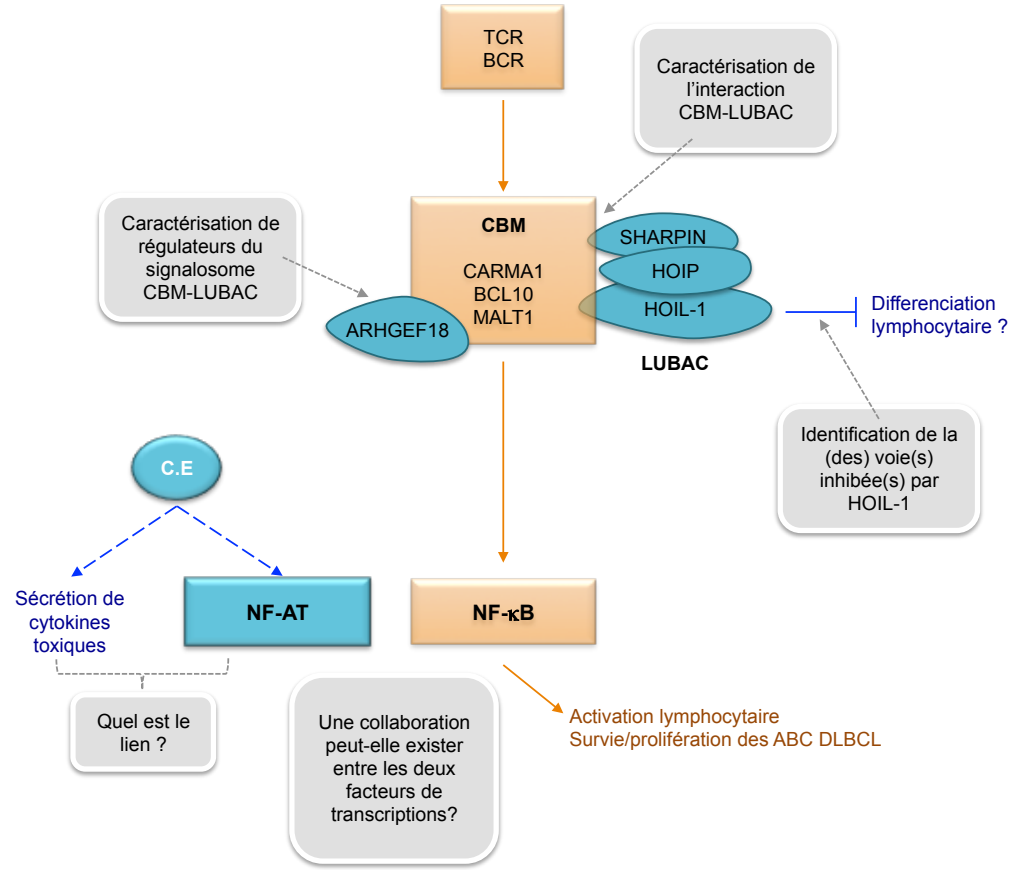


FIGURE 37 : *Les apports de la thèse et les questions en suspens pour les futurs doctorants…*

Déjà établi
Mis en évidence pendant la thèse
Questions en suspens

ANNEXES

Annexe I : Figures 35 and 36 experimental procedures

Cell, reagents and kits

Jurkat cells, Peripheral Blood Mononuclear Cell from healthy donors (Etablissement Français du Sang), ABC DLBCL cell lines (U2932, RIVA, OCI-Ly3, OCI-Ly10, SUDHL2), GCB DLBCL cell lines (OCI-Ly19, BJAB, SUDHL4), Primary Effusion Cell line (BC1) and a cell line from Head and Neck cancer were used. Cells stimulation was perfomed with 20 $ng.ml^{-1}$ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) plus 300 $ng.ml^{-1}$ ionomycin (Calbiochem), with a combinaison of anti CD3 and anti CD28 (BD Biosciences ; 0,5 $\mu g.ml^{-1}$ of each) or with TNFα (10 $ng.ml^{-1}$). Cell viability was assed by incubating cells 2 hours at 37°C with the Uptiblue reagent from Interchim at a 10% final concentration. 40 nM of DiOC6 and 0,1 $\mu g.ml^{-1}$ of Propidium Iodide both from Invitrogen were used. Q-VD-OPh from R&D was used at 50 μM. Compound E from Prestwick was diluted in DMSO. IL-6 and IL-10 secretion was assessed by ELISA using kits from Immuno-tools and IL-2 secretion was monitored with the Quantikine® kit from R&D.

Prestwick screen

The screen was performed using 10 μM of the 1280 FDA approved molecules from Prestwick library in 96 well plates filled with 100 μl of media. 48 hours later, cell viability was assed using uptiblue, according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry

CFSE staining was monitored as described in [370]. CD25 and CD69 staining were assessed using specific antibodies from Immunotools. Samples were analyzed by flow cytometry (C6 accuri and Facs Calibur were used).

Nuclear and cytosol extraction

Nuclear and cytosolic extraction was performed as previously described [345] (see in results section). Antibodies used for immunoblot were: anti-PARP (Santa Cruz), anti-CYLD (Santa Cruz), anti Roquin-1 (Bethyl), anti-c-Rel (Santa Cruz), anti-IκBα (Cell Signaling), anti-tubulin (Santa Cruz), anti-NF-ATc1 (Santa Cruz), anti-NF-ATc2 (Cell Signaling), and anti-GAPDH (Sigma).

Luciferase assay, Immunofluorescence and Cells transfection

Procedures are described in [345] (see in results section).

Mass spectrometry

Cells lysates form stimulated Jurkat cells were immunoprecipitated with antibodies to SHARPIN (Bethyl) or CK1α (Santa Cruz) as indicated in [345]. Samples were analysed by mass spectrometry by a private company.

The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of Nuclear Factor κB signaling

RESEARCH ARTICLE

CELL BIOLOGY

The Endoplasmic Reticulum Acts as a Platform for Ubiquitylated Components of Nuclear Factor κB Signaling

Catherine Alexia,[1,2,3] Konstantinos Poalas,[1,2,3] Gabrielle Carvalho,[1,2,3] Naima Zemirli,[1,2,3] Julie Dwyer,[4,5,6] Sonia M. Dubois,[1,2,3] Emeline M. Hatchi,[1,2,3] Nelia Cordeiro,[1,2,3] Sherri S. Smith,[4,5,6] Céline Castanier,[1,2,3] Armelle Le Guelte,[4,5,6] Liling Wan,[7] Yibin Kang,[7] Aimé Vazquez,[1,2,3] Julie Gavard,[4,5,6] Damien Arnoult,[1,2,3]* Nicolas Bidère[1,2,3]*

The innate and adaptive immune responses involve the stimulation of nuclear factor κB (NF-κB) transcription factors through the Lys[63] (K[63])–linked ubiquitylation of specific components of NF-κB signaling pathways. We found that ubiquitylated components of the NF-κB pathway accumulated on the cytosolic leaflet of the endoplasmic reticulum (ER) membrane after the engagement of cell-surface, proinflammatory cytokine receptors or antigen receptors. Through mass spectrometric analysis, we found that the ER-anchored protein metadherin (MTDH) was a partner for these ubiquitylated activators of NF-κB and that it directly bound to K[63]-linked polyubiquitin chains. Knockdown of MTDH inhibited the accumulation of ubiquitylated NF-κB signaling components at the ER, reduced the extent of NF-κB activation, and decreased the amount of proinflammatory cytokines produced. Our observations highlight an unexpected facet of the ER as a key subcellular gateway for NF-κB activation.

INTRODUCTION

Negative regulation of NF-κB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34

Poalas *et al. Cell Communication and Signaling* 2013, **11**:25
http://www.biosignaling.com/content/11/1/25

CELL COMMUNICATION & SIGNALING

SHORT REPORT Open Access

Negative regulation of NF-κB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34

Konstantinos Poalas[1,2,3], Emeline M Hatchi[1,2,3], Nelia Cordeiro[1,2,3], Sonia M Dubois[1,2,3], Héloïse M Leclair[4,5,6], Claire Leveau[1,2,3], Catherine Alexia[1,2,3], Julie Gavard[4,5,6], Aimé Vazquez[1,2,3] and Nicolas Bidère[1,2,3*]

Abstract

Background: NF-κB is a master gene regulator involved in plethora of biological processes, including lymphocyte activation and proliferation. Reversible ubiquitinylation of key adaptors is required to convey the optimal activation of NF-κB. However the deubiquitinylases (DUBs), which catalyze the removal of these post-translational modifications and participate to reset the system to basal level following T-Cell receptor (TCR) engagement continue to be elucidated.

Findings: Here, we performed an unbiased siRNA library screen targeting the DUBs encoded by the human genome to uncover new regulators of TCR-mediated NF-κB activation. We present evidence that knockdown of Ubiquitin-Specific Protease 34 (USP34) selectively enhanced NF-κB activation driven by TCR engagement, similarly to siRNA against the well-characterized DUB cylindromatosis (CYLD). From a molecular standpoint, USP34 silencing spared upstream signaling but led to a more pronounced degradation of the NF-κB inhibitor IκBα, and culminated with an increased DNA binding activity of the transcription factor.

Conclusions: Collectively, our data unveils USP34 as a new player involved in the fine-tuning of NF-κB upon TCR stimulation.

Keywords: DUBs, NF-κB, Ubiquitinylation, T-Cell receptor

Annexe 4 : Travaux collaboratifs

Control of CXCR2 activity through its ubiquitination on K327

Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation

Leclair *et al. BMC Cell Biology* 2014, **15**:38
http://www.biomedcentral.com/1471-2121/15/38

BMC Cell Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Control of CXCR2 activity through its ubiquitination on K327 residue

Héloise M Leclair[1,2,3], Sonia M Dubois[1,2,3], Sandy Azzi[1,2,3], Julie Dwyer[1,2,3], Nicolas Bidère[1,2,3] and Julie Gavard[1,2,3,4*]

Abstract

Background: The interleukin-8 chemokine (IL-8) G-protein coupled receptor CXCR2 governs pro-inflammatory and pro-angiogenic responses in leukocytes and endothelial cells. At a molecular standpoint, CXCR2 is widely reported to operate through calcium flux, phosphoinoisitide 3 kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). While CXCR2 trafficking is suspected to be intertwined with its signaling, the exact mechanism is not fully elucidated.

Results: Here, we identified the lysine 327 within the CXCR2 C-terminal tail as a key residue for ubiquitination, internalization, and signaling. First, the substitution to an arginine of K327 mutation was associated with a reduction in CXCR2 poly-ubiquitination. While WT CXCR2 was rapidly internalized following IL-8 administration, K327R mutant remained at the plasma membrane. Finally, K327R mutant failed to promote the recruitment of β-arrestin2, as estimated by imagery and bioluminescence resonance transfer. As a consequence, the activation of intracellular signaling, including both early events such as ERK phosphorylation and the increase in calcium flux, and the latter activation of the AP1 and NF-κB transcription factors, was blunted.

Conclusions: Overall, our results demonstrate that CXCR2 ubiquitination on K327 residue modulates agonist-activated CXCR2 cell sorting and intracellular signaling. Thus, the inhibition of K327 ubiquitination might emerge as an effective mean to curb exacerbated CXCR2 signaling in several pathological conditions, such as inflammatory diseases and cancer.

Keywords: Chemokine receptor, Ubiquitination, Arrestin, Internalization, Signaling

Research Article 4137

Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation

Armelle Le Guelte[1,2,3], Eva-Maria Galan-Moya[1,2,3], Julie Dwyer[1,2,3], Lucas Treps[1,2,3], Garance Kettler[1,2,3], Jagoda K. Hebda[1,2,3], Sonia Dubois[4], Cedric Auffray[1,2,3], Herve Chneiweiss[3,5], Nicolas Bidere[4] and Julie Gavard[1,2,3,*]

[1]Cnrs, UMR8104, and [2]Inserm, U1016, 22 rue Mechain, 75014 Paris, France
[3]Universite Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, 6 rue de l'Ecole de Medecine, 75006 Paris, France
[4]Inserm, U1014, 14 rue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif, France
[5]Inserm, U894, 2 ter rue d'Alesia, 75014 Paris, France
*Author for correspondence (julie.gavard@inserm.fr)

Accepted 10 May 2012
Journal of Cell Science 125, 4137–4146
© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd
doi: 10.1242/jcs.108282

Summary

VE-cadherin-mediated cell–cell junction weakening increases paracellular permeability in response to both angiogenic and inflammatory stimuli. Although Semaphorin 3A has emerged as one of the few known anti-angiogenic factors to exhibit pro-permeability activity, little is known about how it triggers vascular leakage. Here we report that Semaphorin 3A induced VE-cadherin serine phosphorylation and internalisation, cell–cell junction destabilisation, and loss of barrier integrity in brain endothelial cells. In addition, high-grade glioma-isolated tumour-initiating cells were found to secrete Semaphorin 3A, which promoted brain endothelial monolayer permeability. From a mechanistic standpoint, Semaphorin 3A impinged upon the basal activity of the serine phosphatase PP2A and disrupted PP2A interaction with VE-cadherin, leading to cell–cell junction disorganization and increased permeability. Accordingly, both pharmacological inhibition and siRNA-based knockdown of PP2A mimicked Semaphorin 3A effects on VE-cadherin. Hence, local Semaphorin 3A production impacts on the PP2A/VE-cadherin equilibrium and contributes to elevated vascular permeability.

Key words: VE-cadherin, Cell–cell junction, Internalisation, Plexin, Glioma stem cell

Journal of Cell Science

BIBLIOGRAPHIE

1. Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., and 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.

2. Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell *46*, 705-716.

3. Kunsch, C., Ruben, S.M., and Rosen, C.A. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. Molecular and cellular biology *12*, 4412-4421.

4. Parry, G.C., and Mackman, N. (1994). A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. The Journal of biological chemistry *269*, 20823-20825.

5. Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell *47*, 921-928.

6. Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. Cell *53*, 211-217.

7. Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.W., and Baltimore, D. (1988). Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology *53 Pt 2*, 789-798.

8. Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. Science *242*, 540-546.

9. Ghosh, S., and Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. Nature *344*, 678-682.

10. DiDonato, J.A., Mercurio, F., and 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*, 1302-1311.

11. Whiteside, S.T., Ernst, M.K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N., and Israel, A. (1995). N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity. Molecular and cellular biology *15*, 5339-5345.

12. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes & development *9*, 1586-1597.

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

14. Chen, Z.J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. Cell *84*, 853-862.

15. Ghosh, S., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P., and Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. Cell *62*, 1019-1029.

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

17. Nolan, G.P., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P., and Baltimore, D. (1991). DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. Cell *64*, 961-969.

18. Mercurio, F., Didonato, J., Rosette, C., and Karin, M. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel Rel/NF-kappa B family member displaying structural and functional homology to NF-kappa B p50/p105. DNA and cell biology *11*, 523-537.

19. Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. Molecular and cellular biology *12*, 674-684.

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

21. Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q., and Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. Nature *391*, 410-413.

22. Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L., and Harrison, S.C. (1995). Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. Nature *373*, 311-317.

23. Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S., and Sigler, P.B. (1995). Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. Nature *373*, 303-310.

24. Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. Immunological reviews *210*, 171-186.

25. O'Dea, E., and Hoffmann, A. (2009). NF-kappaB signaling. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine *1*, 107-115.

26. Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Molecular cell *9*, 625-636.

27. Dobrzanski, P., Ryseck, R.P., and 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*, 4608-4616.

28. Dobrzanski, P., Ryseck, R.P., and Bravo, R. (1993). Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. Molecular and cellular biology *13*, 1572-1582.

29. Gerondakis, S., and Strasser, A. (2003). The role of Rel/NF-kappaB transcription factors in B lymphocyte survival. Seminars in immunology *15*, 159-166.

30. Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., and Grumont, R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. Oncogene *18*, 6888-6895.

31. Zabel, U., and Baeuerle, P.A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. Cell *61*, 255-265.

32. Li, Z., and Nabel, G.J. (1997). A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. Molecular and cellular biology *17*, 6184-6190.

33. Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R., and Israel, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. The EMBO journal *16*, 1413-1426.

34. Simeonidis, S., Liang, S., Chen, G., and Thanos, D. (1997). Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 14372-14377.

35. Yamazaki, S., Muta, T., and Takeshige, K. (2001). A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. The Journal of biological chemistry *276*, 27657-27662.

36. Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K., and Siebenlist, U. (1992). The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. Nature *359*, 339-342.

37. Hatada, E.N., Nieters, A., Wulczyn, F.G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T.W., and Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *89*, 2489-2493.

38. Wulczyn, F.G., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. Nature *358*, 597-599.

39. Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W.E., Osborn, S.L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P.A., Tibaldi, E.V., Hussey, R.E., Kruisbeek, A.M., et al. (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. Molecular cell *9*, 637-648.

40. Yamauchi, S., Ito, H., and Miyajima, A. (2010). IkappaBeta, a nuclear IkappaB protein, positively regulates the NF-kappaB-mediated expression of proinflammatory cytokines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 11924-11929.

41. Rice, N.R., MacKichan, M.L., and Israel, A. (1992). The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. Cell *71*, 243-253.

42. Dobrzanski, P., Ryseck, R.P., and Bravo, R. (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. Oncogene *10*, 1003-1007.

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

44. Inoue, J., Kerr, L.D., Rashid, D., Davis, N., Bose, H.R., Jr., and Verma, I.M. (1992). Direct association of pp40/I kappa B beta with rel/NF-kappa B transcription factors: role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *89*, 4333-4337.

45. Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., and Baldwin, A.S., Jr. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. Genes & development *6*, 1899-1913.

46. Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C., and Ballard, D.W. (1992). I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. Molecular biology of the cell *3*, 1339-1352.

47. Hinz, M., Arslan, S.C., and Scheidereit, C. (2012). It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. Immunological reviews *246*, 59-76.

48. Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1989). A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. Genes & development *3*, 1689-1698.

49. DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., and Karin, M. (1996). Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. Molecular and cellular biology *16*, 1295-1304.

50. Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S., and 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*, 2876-2883.

51. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L., and Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. Science *298*, 1241-1245.

52. Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., and Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. Cell *95*, 759-770.

53. Jacobs, M.D., and Harrison, S.C. (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. Cell *95*, 749-758.

54. Hirano, F., Chung, M., Tanaka, H., Maruyama, N., Makino, I., Moore, D.D., and Scheidereit, C. (1998). Alternative splicing variants of IkappaB beta establish differential NF-kappaB signal responsiveness in human cells. Molecular and cellular biology *18*, 2596-2607.

55. Rao, P., Hayden, M.S., Long, M., Scott, M.L., West, A.P., Zhang, D., Oeckinghaus, A., Lynch, C., Hoffmann, A., Baltimore, D., et al. (2010). IkappaBbeta acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. Nature *466*, 1115-1119.

56. Scheibel, M., Klein, B., Merkle, H., Schulz, M., Fritsch, R., Greten, F.R., Arkan, M.C., Schneider, G., and Schmid, R.M. (2010). IkappaBbeta is an essential co-activator for LPS-induced IL-1beta transcription in vivo. The Journal of experimental medicine *207*, 2621-2630.

57. Lee, S.H., and Hannink, M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). The Journal of biological chemistry *277*, 23358-23366.

58. Naumann, M., Nieters, A., Hatada, E.N., and Scheidereit, C. (1993). NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors. Oncogene *8*, 2275-2281.

59. Naumann, M., Wulczyn, F.G., and Scheidereit, C. (1993). The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. The EMBO journal *12*, 213-222.

60. Lin, L., DeMartino, G.N., and Greene, W.C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. Cell *92*, 819-828.

61. Moorthy, A.K., Savinova, O.V., Ho, J.Q., Wang, V.Y., Vu, D., and Ghosh, G. (2006). The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. The EMBO journal *25*, 1945-1956.

62. Cohen, S., Achbert-Weiner, H., and Ciechanover, A. (2004). Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing. Molecular and cellular biology *24*, 475-486.

63. Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Maiolo, A.T., and Neri, A. (1995). Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. Nucleic acids research *23*, 2328-2336.

64. Ten, R.M., Paya, C.V., Israel, N., Le Bail, O., Mattei, M.G., Virelizier, J.L., Kourilsky, P., and Israel, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. The EMBO journal *11*, 195-203.

65. Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene *18*, 6853-6866.

66. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. Cell *91*, 243-252.

67. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. Nature *395*, 297-300.

68. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. Cell *93*, 1231-1240.

69. Ran, R., Lu, A., Zhang, L., Tang, Y., Zhu, H., Xu, H., Feng, Y., Han, C., Zhou, G., Rigby, A.C., et al. (2004). Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. Genes & development *18*, 1466-1481.

70. Chen, G., Cao, P., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. Molecular cell *9*, 401-410.

71. Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F., and Verma, I.M. (2004). Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. Science *304*, 1963-1967.

72. Zandi, E., Chen, Y., and Karin, M. (1998). Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. Science *281*, 1360-1363.

73. May, M.J., Marienfeld, R.B., and Ghosh, S. (2002). Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. The Journal of biological chemistry *277*, 45992-46000.

74. Marienfeld, R.B., Palkowitsch, L., and Ghosh, S. (2006). Dimerization of the I kappa B kinase-binding domain of NEMO is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activity. Molecular and cellular biology *26*, 9209-9219.

75. Rushe, M., Silvian, L., Bixler, S., Chen, L.L., Cheung, A., Bowes, S., Cuervo, H., Berkowitz, S., Zheng, T., Guckian, K., et al. (2008). Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site. Structure *16*, 798-808.

76. Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. Molecular cell *22*, 245-257.

77. Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. Nature cell biology *8*, 398-406.

78. Bloor, S., Ryzhakov, G., Wagner, S., Butler, P.J., Smith, D.L., Krumbach, R., Dikic, I., and Randow, F. (2008). Signal processing by its coil zipper domain activates IKK gamma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 1279-1284.

79. Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., and Verma, I.M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. Science *284*, 321-325.

80. Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J., and Mak, T.W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. Genes & development *14*, 854-862.

81. Doffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwrick, S., Dupuis-Girod, S., Blanche, S., et al. (2001). X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. Nature genetics *27*, 277-285.

82. Smahi, A., Courtois, G., Vabres, P., Yamaoka, S., Heuertz, S., Munnich, A., Israel, A., Heiss, N.S., Klauck, S.M., Kioschis, P., et al. (2000). Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. Nature *405*, 466-472.

83. Zonana, J., Elder, M.E., Schneider, L.C., Orlow, S.J., Moss, C., Golabi, M., Shapira, S.K., Farndon, P.A., Wara, D.W., Emmal, S.A., et al. (2000). A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). American journal of human genetics *67*, 1555-1562.

84. Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C., and Verma, I.M. (1999). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. Genes & development *13*, 1322-1328.

85. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. Science *284*, 309-313.

86. Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature *412*, 346-351.

87. Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D.V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 3792-3797.

88. Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. The Journal of biological chemistry *279*, 26243-26250.

89. Liang, C., Zhang, M., and Sun, S.C. (2006). beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. Cellular signalling *18*, 1309-1317.

90. Fong, A., and Sun, S.C. (2002). Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. The Journal of biological chemistry *277*, 22111-22114.

91. Cao, Y., Janssen, E.M., Duncan, A.W., Altman, A., Billadeau, D.D., and Abraham, R.T. (2002). Pleiotropic defects in TCR signaling in a Vav-1-null Jurkat T-cell line. The EMBO journal *21*, 4809-4819.

92. Villalba, M., Bi, K., Hu, J., Altman, Y., Bushway, P., Reits, E., Neefjes, J., Baier, G., Abraham, R.T., and Altman, A. (2002). Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. The Journal of cell biology *157*, 253-263.

93. Muller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. Nature reviews. Immunology *10*, 645-656.

94. Costello, P.S., Walters, A.E., Mee, P.J., Turner, M., Reynolds, L.F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 3035-3040.

95. Meuer, S.C., Acuto, O., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F., and Reinherz, E.L. (1983). Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature *303*, 808-810.

96. Clark, M.R., Tanaka, A., Powers, S.E., and Veselits, M. (2011). Receptors, subcellular compartments and the regulation of peripheral B cell responses: the illuminating state of anergy. Molecular immunology *48*, 1281-1286.

97. Weil, R., and Israel, A. (2004). T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. Current opinion in immunology *16*, 374-381.

98. Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D., and Lin, X. (2005). Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. Immunity *23*, 575-585.

99. Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-Garcia, M.E., Ovechkina, Y.L., and Rawlings, D.J. (2005). Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. Immunity *23*, 561-574.

100. Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J., and Thome, M. (2002). CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. Nature immunology *3*, 836-843.

101. Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M., and Tschopp, J. (2001). Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF-kappaB activation. FEBS letters *496*, 121-127.

102. Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M., and Lin, X. (2004). MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. The Journal of biological chemistry *279*, 15870-15876.

103. Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C., and Krappmann, D. (2007). Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. The EMBO journal *26*, 4634-4645.

104. Wu, C.J., and Ashwell, J.D. (2008). NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 3023-3028.

105. Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. Molecular cell *14*, 289-301.

106. Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V.M. (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. Nature *427*, 167-171.

107. Bertin, J., Wang, L., Guo, Y., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Merriam, S., DiStefano, P.S., and Alnemri, E.S. (2001). CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B. The Journal of biological chemistry *276*, 11877-11882.

108. Bidere, N., Ngo, V.N., Lee, J., Collins, C., Zheng, L., Wan, F., Davis, R.E., Lenz, G., Anderson, D.E., Arnoult, D., et al. (2009). Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. Nature *458*, 92-96.

109. Shinohara, H., Maeda, S., Watarai, H., and Kurosaki, T. (2007). IkappaB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells. The Journal of experimental medicine *204*, 3285-3293.

110. Egawa, T., Albrecht, B., Favier, B., Sunshine, M.J., Mirchandani, K., O'Brien, W., Thome, M., and Littman, D.R. (2003). Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. Current biology : CB *13*, 1252-1258.

111. Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Kozieradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., Nghiem, M., Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Bauer, B., et al. (2003). The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. Immunity *18*, 763-775.

112. Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., et al. (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. Cell *96*, 35-45.

113. Spencer, J. (1999). Aggressive mucosa associated lymphoid tissue lymphomas are associated with mutations in Bcl10. Gut *44*, 778-779.

114. Isaacson, P.G. (2005). Update on MALT lymphomas. Best practice & research. Clinical haematology *18*, 57-68.

115. Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S., et al. (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. Cell *104*, 33-42.

116. Xue, L., Morris, S.W., Orihuela, C., Tuomanen, E., Cui, X., Wen, R., and Wang, D. (2003). Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells. Nature immunology *4*, 857-865.

117. Lobry, C., Lopez, T., Israel, A., and Weil, R. (2007). Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 908-913.

118. Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A., and Krappmann, D. (2004). Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF-kappa B signaling. Molecular and cellular biology *24*, 3860-3873.

119. Paul, S., Kashyap, A.K., Jia, W., He, Y.W., and Schaefer, B.C. (2012). Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB. Immunity *36*, 947-958.

120. Park, Y., Jin, H.S., and Liu, Y.C. (2013). Regulation of T cell function by the ubiquitin-specific protease USP9X via modulating the Carma1-Bcl10-Malt1 complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 9433-9438.

121. Naik, E., Webster, J.D., DeVoss, J., Liu, J., Suriben, R., and Dixit, V.M. (2014). Regulation of proximal T cell receptor signaling and tolerance induction by deubiquitinase Usp9X. The Journal of experimental medicine *211*, 1947-1955.

122. Rueda, D., Gaide, O., Ho, L., Lewkowicz, E., Niedergang, F., Hailfinger, S., Rebeaud, F., Guzzardi, M., Conne, B., Thelen, M., et al. (2007). Bcl10 controls TCR- and FcgammaR-induced actin polymerization. Journal of immunology *178*, 4373-4384.

123. Wegener, E., Oeckinghaus, A., Papadopoulou, N., Lavitas, L., Schmidt-Supprian, M., Ferch, U., Mak, T.W., Ruland, J., Heissmeyer, V., and Krappmann, D. (2006). Essential role for IkappaB kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. Molecular cell *23*, 13-23.

124. Palkowitsch, L., Marienfeld, U., Brunner, C., Eitelhuber, A., Krappmann, D., and Marienfeld, R.B. (2011). The Ca2+-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation. The Journal of biological chemistry *286*, 7522-7534.

125. Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E.M., Rufer, N., et al. (2008). The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. Nature immunology *9*, 272-281.

126. Marion, S., Mazzolini, J., Herit, F., Bourdoncle, P., Kambou-Pene, N., Hailfinger, S., Sachse, M., Ruland, J., Benmerah, A., Echard, A., et al. (2012). The NF-kappaB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. Developmental cell *23*, 954-967.

127. Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. Molecular cell *6*, 961-967.

128. Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A., and Mak, T.W. (2003). Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. Immunity *19*, 749-758.

129. Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003). Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. Science *302*, 1581-1584.

130. Ferch, U., zum Buschenfelde, C.M., Gewies, A., Wegener, E., Rauser, S., Peschel, C., Krappmann, D., and Ruland, J. (2007). MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. Nature immunology *8*, 984-991.

131. Guiet, C., and Vito, P. (2000). Caspase recruitment domain (CARD)-dependent cytoplasmic filaments mediate bcl10-induced NF-kappaB activation. The Journal of cell biology *148*, 1131-1140.

132. Rossman, J.S., Stoicheva, N.G., Langel, F.D., Patterson, G.H., Lippincott-Schwartz, J., and Schaefer, B.C. (2006). POLKADOTS are foci of functional interactions in T-Cell receptor-mediated signaling to NF-kappaB. Molecular biology of the cell *17*, 2166-2176.

133. Paul, S., Traver, M.K., Kashyap, A.K., Washington, M.A., Latoche, J.R., and Schaefer, B.C. (2014). T cell receptor signals to NF-kappaB are transmitted by a cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK signalosome. Science signaling *7*, ra45.

134. Qiao, Q., Yang, C., Zheng, C., Fontan, L., David, L., Yu, X., Bracken, C., Rosen, M., Melnick, A., Egelman, E.H., et al. (2013). Structural architecture of the CARMA1/Bcl10/MALT1 signalosome: nucleation-induced filamentous assembly. Molecular cell *51*, 766-779.

135. Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., and Lenardo, M. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. Science *307*, 1465-1468.

136. Duwel, M., Welteke, V., Oeckinghaus, A., Baens, M., Kloo, B., Ferch, U., Darnay, B.G., Ruland, J., Marynen, P., and Krappmann, D. (2009). A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. Journal of immunology *182*, 7718-7728.

137. Eitelhuber, A.C., Warth, S., Schimmack, G., Duwel, M., Hadian, K., Demski, K., Beisker, W., Shinohara, H., Kurosaki, T., Heissmeyer, V., et al. (2011). Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T-cell activation. The EMBO journal *30*, 594-605.

138. Schimmack, G., Eitelhuber, A.C., Vincendeau, M., Demski, K., Shinohara, H., Kurosaki, T., and Krappmann, D. (2014). AIP augments CARMA1-BCL10-MALT1 complex formation to facilitate NF-kappaB signaling upon T cell activation. Cell communication and signaling : CCS *12*, 49.

139. Brenner, D., Brechmann, M., Rohling, S., Tapernoux, M., Mock, T., Winter, D., Lehmann, W.D., Kiefer, F., Thome, M., Krammer, P.H., et al. (2009). Phosphorylation of CARMA1 by HPK1 is critical for NF-kappaB activation in T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 14508-14513.

140. Lamason, R.L., Kupfer, A., and Pomerantz, J.L. (2010). The dynamic distribution of CARD11 at the immunological synapse is regulated by the inhibitory kinesin GAKIN. Molecular cell *40*, 798-809.

141. Yu, J.W., Jeffrey, P.D., Ha, J.Y., Yang, X., and Shi, Y. (2011). Crystal structure of the mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1 (MALT1) paracaspase region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 21004-21009.

142. Wiesmann, C., Leder, L., Blank, J., Bernardi, A., Melkko, S., Decock, A., D'Arcy, A., Villard, F., Erbel, P., Hughes, N., et al. (2012). Structural determinants of MALT1 protease activity. Journal of molecular biology *419*, 4-21.

143. Fontan, L., Yang, C., Kabaleeswaran, V., Volpon, L., Osborne, M.J., Beltran, E., Garcia, M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Yang, S.N., et al. (2012). MALT1 small molecule inhibitors specifically suppress ABC-DLBCL in vitro and in vivo. Cancer cell *22*, 812-824.

144. Nagel, D., Spranger, S., Vincendeau, M., Grau, M., Raffegerst, S., Kloo, B., Hlahla, D., Neuenschwander, M., Peter von Kries, J., Hadian, K., et al. (2012). Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. Cancer cell *22*, 825-837.

145. Coornaert, B., Baens, M., Heyninck, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., Sun, L., Chen, Z.J., Marynen, P., and Beyaert, R. (2008). T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. Nature immunology *9*, 263-271.

146. Hailfinger, S., Nogai, H., Pelzer, C., Jaworski, M., Cabalzar, K., Charton, J.E., Guzzardi, M., Decaillet, C., Grau, M., Dorken, B., et al. (2011). Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 14596-14601.

147. Staal, J., Driege, Y., Bekaert, T., Demeyer, A., Muyllaert, D., Van Damme, P., Gevaert, K., and Beyaert, R. (2011). T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. The EMBO journal *30*, 1742-1752.

148. Jeltsch, K.M., Hu, D., Brenner, S., Zoller, J., Heinz, G.A., Nagel, D., Vogel, K.U., Rehage, N., Warth, S.C., Edelmann, S.L., et al. (2014). Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote T(H)17 differentiation. Nature immunology *15*, 1079-1089.

149. Uehata, T., Iwasaki, H., Vandenbon, A., Matsushita, K., Hernandez-Cuellar, E., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Mino, T., Suzuki, Y., Standley, D.M., et al. (2013). Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. Cell *153*, 1036-1049.

150. Gewies, A., Gorka, O., Bergmann, H., Pechloff, K., Petermann, F., Jeltsch, K.M., Rudelius, M., Kriegsmann, M., Weichert, W., Horsch, M., et al. (2014). Uncoupling Malt1 threshold function from paracaspase activity results in destructive autoimmune inflammation. Cell reports *9*, 1292-1305.

151. Jaworski, M., Marsland, B.J., Gehrig, J., Held, W., Favre, S., Luther, S.A., Perroud, M., Golshayan, D., Gaide, O., and Thome, M. (2014). Malt1 protease inactivation efficiently dampens immune responses but causes spontaneous autoimmunity. The EMBO journal *33*, 2765-2781.

152. Bornancin, F., Renner, F., Touil, R., Sic, H., Kolb, Y., Touil-Allaoui, I., Rush, J.S., Smith, P.A., Bigaud, M., Junker-Walker, U., et al. (2015). Deficiency of MALT1 Paracaspase Activity Results in Unbalanced Regulatory and Effector T and B Cell Responses Leading to Multiorgan Inflammation. Journal of immunology.

153. Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *72*, 11-15.

154. Goldknopf, I.L., and Busch, H. (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *74*, 864-868.

155. Hunt, L.T., and Dayhoff, M.O. (1977). Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the nonhistone component of nuclear protein A24. Biochemical and biophysical research communications *74*, 650-655.

156. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *77*, 1783-1786.

157. Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. The Journal of biological chemistry *258*, 8206-8214.

158. Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., and Hershko, A. (1982). "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. The Journal of biological chemistry *257*, 2537-2542.

159. Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. Nature reviews. Molecular cell biology *10*, 659-671.

160. Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., and Barford, D. (2009). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. EMBO reports *10*, 466-473.

161. Cook, W.J., Jeffrey, L.C., Kasperek, E., and Pickart, C.M. (1994). Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed. Journal of molecular biology *236*, 601-609.

162. Eddins, M.J., Carlile, C.M., Gomez, K.M., Pickart, C.M., and Wolberger, C. (2006). Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. Nature structural & molecular biology *13*, 915-920.

163. Pickart, C.M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. Current opinion in chemical biology *8*, 610-616.

164. Strieter, E.R., and Korasick, D.A. (2012). Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. ACS chemical biology *7*, 52-63.

165. Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annual review of biochemistry *70*, 503-533.

166. Wertz, I.E., and Dixit, V.M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. Cold Spring Harbor perspectives in biology *2*, a003350.

167. Chen, Z.J., and Sun, L.J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. Molecular cell *33*, 275-286.

168. Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. The Journal of biological chemistry *270*, 17442-17456.

169. Al-Hakim, A.K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M., and Alessi, D.R. (2008). Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. The Biochemical journal *411*, 249-260.

170. Wickliffe, K.E., Williamson, A., Meyer, H.J., Kelly, A., and Rape, M. (2011). K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. Trends in cell biology *21*, 656-663.

171. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. Annual review of biochemistry *67*, 425-479.

172. Yuan, W.C., Lee, Y.R., Lin, S.Y., Chang, L.Y., Tan, Y.P., Hung, C.C., Kuo, J.C., Liu, C.H., Lin, M.Y., Xu, M., et al. (2014). K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. Molecular cell *54*, 586-600.

173. Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015). RNF168 Promotes Noncanonical K27 Ubiquitination to Signal DNA Damage. Cell reports.

174. Rieser, E., Cordier, S.M., and Walczak, H. (2013). Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. Trends in biochemical sciences *38*, 94-102.

175. Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annual review of cell and developmental biology *19*, 141-172.

176. Pelzer, C., Cabalzar, K., Wolf, A., Gonzalez, M., Lenz, G., and Thome, M. (2013). The protease activity of the paracaspase MALT1 is controlled by monoubiquitination. Nature immunology *14*, 337-345.

177. Wu-Baer, F., Lagrazon, K., Yuan, W., and Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. The Journal of biological chemistry *278*, 34743-34746.

178. Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R.E., Fukuda, M., and Ohta, T. (2004). Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. The Journal of biological chemistry *279*, 3916-3924.

179. Morris, J.R., and Solomon, E. (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. Human molecular genetics *13*, 807-817.

180. Harper, J.W., and Schulman, B.A. (2006). Structural complexity in ubiquitin recognition. Cell *124*, 1133-1136.

181. Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., and Joazeiro, C.A. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. PloS one *3*, e1487.

182. Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. Nature reviews. Molecular cell biology *10*, 755-764.

183. Wickliffe, K.E., Lorenz, S., Wemmer, D.E., Kuriyan, J., and Rape, M. (2011). The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. Cell *144*, 769-781.

184. Kim, H.C., and Huibregtse, J.M. (2009). Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. Molecular and cellular biology *29*, 3307-3318.

185. Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. Annual review of biochemistry *78*, 399-434.

186. Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., and Pavletich, N.P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. Science *286*, 1321-1326.

187. Wenzel, D.M., and Klevit, R.E. (2012). Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases. BMC biology *10*, 24.

188. Budhidarmo, R., Nakatani, Y., and Day, C.L. (2012). RINGs hold the key to ubiquitin transfer. Trends in biochemical sciences *37*, 58-65.

189. Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 5249.

190. Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. Cell *123*, 773-786.

191. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P.A. (1993). Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. Nature *365*, 182-185.

192. Lin, L., and Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. Molecular and cellular biology *16*, 2248-2254.

193. Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. Nature reviews. Molecular cell biology *6*, 9-20.

194. Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F., and Ben-Neriah, Y. (1998). Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. Nature *396*, 590-594.

195. Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends in biochemical sciences *24*, 181-185.

196. Hu, S., Du, M.Q., Park, S.M., Alcivar, A., Qu, L., Gupta, S., Tang, J., Baens, M., Ye, H., Lee, T.H., et al. (2006). cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. The Journal of clinical investigation *116*, 174-181.

197. Carvalho, G., Le Guelte, A., Demian, C., Vazquez, A., Gavard, J., and Bidere, N. (2010). Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation. Journal of cell science *123*, 2375-2380.

198. Alexia, C., Poalas, K., Carvalho, G., Zemirli, N., Dwyer, J., Dubois, S.M., Hatchi, E.M., Cordeiro, N., Smith, S.S., Castanier, C., et al. (2013). The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling. Science signaling *6*, ra79.

199. King, C.G., Kobayashi, T., Cejas, P.J., Kim, T., Yoon, K., Kim, G.K., Chiffoleau, E., Hickman, S.P., Walsh, P.T., Turka, L.A., et al. (2006). TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. Nature medicine *12*, 1088-1092.

200. Hachmann, J., Edgington-Mitchell, L.E., Poreba, M., Sanman, L.E., Drag, M., Bogyo, M., and Salvesen, G.S. (2015). Probes to monitor activity of the paracaspase MALT1. Chemistry & biology *22*, 139-147.

201. Moreno-Garcia, M.E., Sommer, K., Shinohara, H., Bandaranayake, A.D., Kurosaki, T., and Rawlings, D.J. (2010). MAGUK-controlled ubiquitination of CARMA1 modulates lymphocyte NF-kappaB activity. Molecular and cellular biology *30*, 922-934.

202. Yamamoto, M., Sato, S., Saitoh, T., Sakurai, H., Uematsu, S., Kawai, T., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006). Cutting Edge: Pivotal function of Ubc13 in thymocyte TCR signaling. Journal of immunology *177*, 7520-7524.

203. Ni, C.Y., Wu, Z.H., Florence, W.C., Parekh, V.V., Arrate, M.P., Pierce, S., Schweitzer, B., Van Kaer, L., Joyce, S., Miyamoto, S., et al. (2008). Cutting edge: K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo. Journal of immunology *180*, 7107-7111.

204. Israel, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. Cold Spring Harbor perspectives in biology *2*, a000158.

205. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. The EMBO journal *25*, 4877-4887.

206. Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. (2011). SHARPIN is a component of the NF-kappaB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. Nature *471*, 633-636.

207. Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skanland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., et al. (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. Nature *471*, 637-641.

208. Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W., et al. (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. Nature *471*, 591-596.

209. Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., et al. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. Nature cell biology *11*, 123-132.

210. Smit, J.J., Monteferrario, D., Noordermeer, S.M., van Dijk, W.J., van der Reijden, B.A., and Sixma, T.K. (2012). The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension. The EMBO journal *31*, 3833-3844.

211. Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, T.A., Morishima, I., Minato, N., Ishimori, K., and Iwai, K. (2003). Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. Nature cell biology *5*, 336-340.

212. Marin, I., Lucas, J.I., Gradilla, A.C., and Ferrus, A. (2004). Parkin and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases. Physiological genomics *17*, 253-263.

213. Chaugule, V.K., Burchell, L., Barber, K.R., Sidhu, A., Leslie, S.J., Shaw, G.S., and Walden, H. (2011). Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. The EMBO journal *30*, 2853-2867.

214. Tian, Y., Zhang, Y., Zhong, B., Wang, Y.Y., Diao, F.C., Wang, R.P., Zhang, M., Chen, D.Y., Zhai, Z.H., and Shu, H.B. (2007). RBCK1 negatively regulates tumor necrosis factor- and interleukin-1-triggered NF-kappaB activation by targeting TAB2/3 for degradation. The Journal of biological chemistry *282*, 16776-16782.

215. MacDuff, D.A., Reese, T.A., Kimmey, J.M., Weiss, L.A., Song, C., Zhang, X., Kambal, A., Duan, E., Carrero, J.A., Boisson, B., et al. (2015). Phenotypic complementation of genetic immunodeficiency by chronic herpesvirus infection. eLife *4*.

216. Niu, J., Shi, Y., Iwai, K., and Wu, Z.H. (2011). LUBAC regulates NF-kappaB activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. The EMBO journal *30*, 3741-3753.

217. Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israel, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., et al. (2012). Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. Nature immunology *13*, 1178-1186.

218. Tarantino, N., Tinevez, J.Y., Crowell, E.F., Boisson, B., Henriques, R., Mhlanga, M., Agou, F., Israel, A., and Laplantine, E. (2014). TNF and IL-1 exhibit distinct ubiquitin requirements for inducing NEMO-IKK supramolecular structures. The Journal of cell biology *204*, 231-245.

219. Nilsson, J., Schoser, B., Laforet, P., Kalev, O., Lindberg, C., Romero, N.B., Davila Lopez, M., Akman, H.O., Wahbi, K., Iglseder, S., et al. (2013). Polyglucosan body myopathy caused by defective ubiquitin ligase RBCK1. Annals of neurology *74*, 914-919.

220. Wang, K., Kim, C., Bradfield, J., Guo, Y., Toskala, E., Otieno, F.G., Hou, C., Thomas, K., Cardinale, C., Lyon, G.J., et al. (2013). Whole-genome DNA/RNA sequencing identifies truncating mutations in RBCK1 in a novel Mendelian disease with neuromuscular and cardiac involvement. Genome medicine *5*, 67.

221. Stieglitz, B., Rana, R.R., Koliopoulos, M.G., Morris-Davies, A.C., Schaeffer, V., Christodoulou, E., Howell, S., Brown, N.R., Dikic, I., and Rittinger, K. (2013). Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP. Nature *503*, 422-426.

222. Peltzer, N., Rieser, E., Taraborrelli, L., Draber, P., Darding, M., Pernaute, B., Shimizu, Y., Sarr, A., Draberova, H., Montinaro, A., et al. (2014). HOIP deficiency causes embryonic lethality by aberrant TNFR1-mediated endothelial cell death. Cell reports *9*, 153-165.

223. Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, T., et al. (2013). Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. The EMBO journal *32*, 2463-2476.

224. Boisson, B., Laplantine, E., Dobbs, K., Cobat, A., Tarantino, N., Hazen, M., Lidov, H.G., Hopkins, G., Du, L., Belkadi, A., et al. (2015). Human HOIP and LUBAC deficiency underlies autoinflammation, immunodeficiency, amylopectinosis, and lymphangiectasia. The Journal of experimental medicine *212*, 939-951.

225. Seymour, R.E., Hasham, M.G., Cox, G.A., Shultz, L.D., Hogenesch, H., Roopenian, D.C., and Sundberg, J.P. (2007). Spontaneous mutations in the mouse Sharpin gene result in multiorgan inflammation, immune system dysregulation and dermatitis. Genes and immunity *8*, 416-421.

226. Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., et al. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly

complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. Molecular cell *36*, 831-844.

227. Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., et al. (2009). Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. Cell *136*, 1098-1109.

228. Lo, Y.C., Lin, S.C., Rospigliosi, C.C., Conze, D.B., Wu, C.J., Ashwell, J.D., Eliezer, D., and Wu, H. (2009). Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. Molecular cell *33*, 602-615.

229. Emmerich, C.H., Ordureau, A., Strickson, S., Arthur, J.S., Pedrioli, P.G., Komander, D., and Cohen, P. (2013). Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 15247-15252.

230. Xia, Z.P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. Nature *461*, 114-119.

231. Evans, P.C., Ovaa, H., Hamon, M., Kilshaw, P.J., Hamm, S., Bauer, S., Ploegh, H.L., and Smith, T.S. (2004). Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. The Biochemical journal *378*, 727-734.

232. Heyninck, K., De Valck, D., Vanden Berghe, W., Van Criekinge, W., Contreras, R., Fiers, W., Haegeman, G., and Beyaert, R. (1999). The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. The Journal of cell biology *145*, 1471-1482.

233. Jaattela, M., Mouritzen, H., Elling, F., and Bastholm, L. (1996). A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. Journal of immunology *156*, 1166-1173.

234. Lin, S.C., Chung, J.Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y.C., Lam, A.Y., Darnay, B.G., and Wu, H. (2008). Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. Journal of molecular biology *376*, 526-540.

235. Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., et al. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. Nature *430*, 694-699.

236. Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., and Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Science *289*, 2350-2354.

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

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

239. Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tsichritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. Nature *424*, 793-796.

240. Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S.C. (2004). Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. The Journal of biological chemistry *279*, 55161-55167.

241. Reiley, W.W., Jin, W., Lee, A.J., Wright, A., Wu, X., Tewalt, E.F., Leonard, T.O., Norbury, C.C., Fitzpatrick, L., Zhang, M., et al. (2007). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. The Journal of experimental medicine *204*, 1475-1485.

242. Reiley, W.W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K.B., Norbury, C.C., and Sun, S.C. (2006). Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. Nature immunology *7*, 411-417.

243. Jin, W., Reiley, W.R., Lee, A.J., Wright, A., Wu, X., Zhang, M., and Sun, S.C. (2007). Deubiquitinating enzyme CYLD regulates the peripheral development and naive phenotype maintenance of B cells. The Journal of biological chemistry *282*, 15884-15893.

244. Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S.T., Ma, C.A., Fuss, I.J., Derry, J.M., and Jain, A. (2006). Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. The Journal of clinical investigation *116*, 3042-3049.

245. Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., and Fassler, R. (2006). Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. Cell *125*, 665-677.

246. Rivkin, E., Almeida, S.M., Ceccarelli, D.F., Juang, Y.C., MacLean, T.A., Srikumar, T., Huang, H., Dunham, W.H., Fukumura, R., Xie, G., et al. (2013). The linear ubiquitin-specific deubiquitinase gumby regulates angiogenesis. Nature *498*, 318-324.

247. Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Wagner, S.A., Keusekotten, K., Fritsch, M., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Choudhary, C., Komander, D., and Gyrd-Hansen, M. (2013). OTULIN restricts Met1-linked ubiquitination to control innate immune signaling. Molecular cell *50*, 818-830.

248. Keusekotten, K., Elliott, P.R., Glockner, L., Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M.K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., et al. (2013). OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin. Cell *153*, 1312-1326.

249. Schaeffer, V., Akutsu, M., Olma, M.H., Gomes, L.C., Kawasaki, M., and Dikic, I. (2014). Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF-kappaB signaling. Molecular cell *54*, 349-361.

250. Elliott, P.R., Nielsen, S.V., Marco-Casanova, P., Fiil, B.K., Keusekotten, K., Mailand, N., Freund, S.M., Gyrd-Hansen, M., and Komander, D. (2014). Molecular basis and regulation of OTULIN-LUBAC interaction. Molecular cell *54*, 335-348.

251. Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbant glands and spleen. Med.-Chir. Trans. *17* 68-114

252. Wilk, S. (1865). Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease) with remarks. Guy's Hosp Rep. *11*, 56–67.

253. Greenfield. W (1878). Specimens illustrative of the pathology of lymphadenoma and leukocythemia. Transactions of the Pathological Society of London *29*, 272-304.

254. Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige, unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. Zeitschrift für Heilkunde, Prague *19*, 21-90.

255. Reed, D.M. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation totuberculosis. Johns Hopkins Hosp. Rep. *10*, 133-196.

256. Delsol, G. (2008). [The 2008 WHO lymphoma classification]. Annales de pathologie *28 Spec No 1*, S20-24.

257. Margaris, K.N., and Black, R.A. (2012). Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society *9*, 601-612.

258. Zhang, J., MacLennan, I.C., Liu, Y.J., and Lane, P.J. (1988). Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? Immunology letters *18*, 297-299.

259. Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y., and MacLennan, I.C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. European journal of immunology *21*, 2951-2962.

260. Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. Annual review of immunology *30*, 429-457.

261. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. The New England journal of medicine *341*, 1520-1529.

262. Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nature reviews. Immunology *15*, 172-184.

263. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 2639-2644.

264. Niu, H., Ye, B.H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. Genes & development *12*, 1953-1961.

265. Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and 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*, 280-292.

266. Duan, S., Cermak, L., Pagan, J.K., Rossi, M., Martinengo, C., di Celle, P.F., Chapuy, B., Shipp, M., Chiarle, R., and Pagano, M. (2012). FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. Nature *481*, 90-93.

267. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. Blood *101*, 2914-2923.

268. Polo, J.M., Dell'Oso, T., Ranuncolo, S.M., Cerchietti, L., Beck, D., Da Silva, G.F., Prive, G.G., Licht, J.D., and Melnick, A. (2004). Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. Nature medicine *10*, 1329-1335.

269. Ye, B.H., Chaganti, S., Chang, C.C., Niu, H., Corradini, P., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. The EMBO journal *14*, 6209-6217.

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

271. Baron, B.W., Anastasi, J., Montag, A., Huo, D., Baron, R.M., Karrison, T., Thirman, M.J., Subudhi, S.K., Chin, R.K., Felsher, D.W., et al. (2004). The human BCL6 transgene promotes the development of lymphomas in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 14198-14203.

272. Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. Genes & development *22*, 2755-2766.

273. Dominguez-Sola, D., Victora, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. Nature immunology *13*, 1083-1091.

274. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *79*, 7824-7827.

275. Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *79*, 7837-7841.

276. Wilker, P.R., Kohyama, M., Sandau, M.M., Albring, J.C., Nakagawa, O., Schwarz, J.J., and Murphy, K.M. (2008). Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. Nature immunology *9*, 603-612.

277. Ying, C.Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I.C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2013). MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. Nature immunology *14*, 1084-1092.

278. Velichutina, I., Shaknovich, R., Geng, H., Johnson, N.A., Gascoyne, R.D., Melnick, A.M., and Elemento, O. (2010). EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. Blood *116*, 5247-5255.

279. Beguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. Cancer cell *23*, 677-692.

280. Victora, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. Blood *120*, 2240-2248.

281. Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., et al. (2012). Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. Nature *490*, 116-120.

282. Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. Immunity *25*, 225-236.

283. Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., et al. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. Immunity *26*, 555-566.

284. Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. Nature *412*, 300-307.

285. Yang, Y., Shaffer, A.L., 3rd, Emre, N.C., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., et al. (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. Cancer cell *21*, 723-737.

286. Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S.V., Aster, J.C., Murty, V.V., Shipp, M.A., and Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. The Journal of experimental medicine *203*, 311-317.

287. Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature *403*, 503-511.

288. Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovsky, A., Pasqualucci, L., et al. (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. Cancer cell *18*, 568-579.

289. Compagno, M., Lim, W.K., Grunn, A., Nandula, S.V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., et al. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. Nature *459*, 717-721.

290. Lenz, G., Wright, G., Dave, S.S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., et al. (2008). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. The New England journal of medicine *359*, 2313-2323.

291. Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nature genetics *42*, 181-185.

292. Aukema, S.M., Siebert, R., Schuuring, E., van Imhoff, G.W., Kluin-Nelemans, H.C., Boerma, E.J., and Kluin, P.M. (2011). Double-hit B-cell lymphomas. Blood *117*, 2319-2331.

293. Li, S., Lin, P., Young, K.H., Kanagal-Shamanna, R., Yin, C.C., and Medeiros, L.J. (2013). MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. Advances in anatomic pathology *20*, 315-326.

294. Muppidi, J.R., Schmitz, R., Green, J.A., Xiao, W., Larsen, A.B., Braun, S.E., An, J., Xu, Y., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2014). Loss of signalling via Galpha13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. Nature *516*, 254-258.

295. Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., et al. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. The Journal of experimental medicine *198*, 851-862.

296. Steidl, C., and Gascoyne, R.D. (2011). The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood *118*, 2659-2669.

297. Montesinos-Rongen, M., Brunn, A., Bentink, S., Basso, K., Lim, W.K., Klapper, W., Schaller, C., Reifenberger, G., Rubenstein, J., Wiestler, O.D., et al. (2008). Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. Leukemia *22*, 400-405.

298. Courts, C., Montesinos-Rongen, M., Martin-Subero, J.I., Brunn, A., Siemer, D., Zuhlke-Jenisch, R., Pels, H., Jurgens, A., Schlegel, U., Schmidt-Wolf, I.G., et al. (2007). Transcriptional profiling of the nuclear factor-kappaB pathway identifies a subgroup of primary lymphoma of the central nervous system with low BCL10 expression. Journal of neuropathology and experimental neurology *66*, 230-237.

299. Richter, J., Ammerpohl, O., Martin-Subero, J.I., Montesinos-Rongen, M., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Wiestler, O.D., Deckert, M., and Siebert, R. (2009). Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system. BMC cancer *9*, 455.

300. Wang, J., Guo, Z., Ma, E., Xing, D., Qiu, B.O., and Wang, Y. (2015). Diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma: A report of nine cases and literature review. Oncology letters *9*, 1795-1801.

301. Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. Nature genetics *43*, 830-837.

302. Lohr, J.G., Stojanov, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Chapuy, B., Sougnez, C., Cruz-Gordillo, P., Knoechel, B., Asmann, Y.W., Slager, S.L., et al. (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 3879-3884.

303. Zhang, J., Grubor, V., Love, C.L., Banerjee, A., Richards, K.L., Mieczkowski, P.A., Dunphy, C., Choi, W., Au, W.Y., Srivastava, G., et al. (2013). Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 1398-1403.

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

305. Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelet, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., et al. (2005). Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *11*, 28-40.

306. Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., et al. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. Nature *441*, 106-110.

307. Lenz, G., Davis, R.E., Ngo, V.N., Lam, L., George, T.C., Wright, G.W., Dave, S.S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., et al. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. Science *319*, 1676-1679.

308. Lamason, R.L., McCully, R.R., Lew, S.M., and Pomerantz, J.L. (2010). Oncogenic CARD11 mutations induce hyperactive signaling by disrupting autoinhibition by the PKC-responsive inhibitory domain. Biochemistry *49*, 8240-8250.

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

310. Chan, V.W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A.L., and Lowell, C.A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. Immunity *7*, 69-81.

311. Ma, H., Yankee, T.M., Hu, J., Asai, D.J., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (2001). Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization. Journal of immunology *166*, 1507-1516.

312. Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. Cell *117*, 787-800.

313. Lam, K.P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. Cell *90*, 1073-1083.

314. Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. Molecular immunology *41*, 599-613.

315. Ngo, V.N., Young, R.M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., et al. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature *470*, 115-119.

316. Ishii, K.J., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. Trends in immunology *27*, 525-532.

317. Ferch, U., Kloo, B., Gewies, A., Pfander, V., Duwel, M., Peschel, C., Krappmann, D., and Ruland, J. (2009). Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. The Journal of experimental medicine *206*, 2313-2320.

318. Hailfinger, S., Lenz, G., Ngo, V., Posvitz-Fejfar, A., Rebeaud, F., Guzzardi, M., Penas, E.M., Dierlamm, J., Chan, W.C., Staudt, L.M., et al. (2009). Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 19946-19951.

319. Lam, L.T., Wright, G., Davis, R.E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J.W., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., and Staudt, L.M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-{kappa}B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood *111*, 3701-3713.

320. Ding, B.B., Yu, J.J., Yu, R.Y., Mendez, L.M., Shaknovich, R., Zhang, Y., Cattoretti, G., and Ye, B.H. (2008). Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. Blood *111*, 1515-1523.

321. Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. Journal of cellular physiology *197*, 157-168.

322. Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. Immunity *17*, 51-62.

323. Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2011). Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. Cancer cell *20*, 728-740.

324. DeVita, V.T., Jr., Canellos, G.P., Chabner, B., Schein, P., Hubbard, S.P., and Young, R.C. (1975). Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. Lancet *1*, 248-250.

325. Fisher, R.I., Gaynor, E.R., Dahlberg, S., Oken, M.M., Grogan, T.M., Mize, E.M., Glick, J.H., Coltman, C.A., Jr., and Miller, T.P. (1993). Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. The New England journal of medicine *328*, 1002-1006.

326. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. The New England journal of medicine *346*, 235-242.

327. Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O., and Glennie, M.J. (2005). The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. Current directions in autoimmunity *8*, 140-174.

328. Strauss, S.J., Higginbottom, K., Juliger, S., Maharaj, L., Allen, P., Schenkein, D., Lister, T.A., and Joel, S.P. (2007). The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. Cancer research *67*, 2783-2790.

329. Ruan, J., Martin, P., Furman, R.R., Lee, S.M., Cheung, K., Vose, J.M., Lacasce, A., Morrison, J., Elstrom, R., Ely, S., et al. (2011). Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *29*, 690-697.

330. Kim, S.W., Oleksyn, D.W., Rossi, R.M., Jordan, C.T., Sanz, I., Chen, L., and Zhao, J. (2008). Protein kinase C-associated kinase is required for NF-kappaB signaling and survival in diffuse large B-cell lymphoma cells. Blood *111*, 1644-1653.

331. Robertson, M.J., Kahl, B.S., Vose, J.M., de Vos, S., Laughlin, M., Flynn, P.J., Rowland, K., Cruz, J.C., Goldberg, S.L., Musib, L., et al. (2007). Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *25*, 1741-1746.

332. Naylor, T.L., Tang, H., Ratsch, B.A., Enns, A., Loo, A., Chen, L., Lenz, P., Waters, N.J., Schuler, W., Dorken, B., et al. (2011). Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. Cancer research *71*, 2643-2653.

333. Milhollen, M.A., Traore, T., Adams-Duffy, J., Thomas, M.P., Berger, A.J., Dang, L., Dick, L.R., Garnsey, J.J., Koenig, E., Langston, S.P., et al. (2010). MLN4924, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in diffuse large B-cell lymphoma models: rationale for treatment of NF-{kappa}B-dependent lymphoma. Blood *116*, 1515-1523.

334. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00379574.

335. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01276717

336. Hernandez-Ilizaliturri, F.J., Deeb, G., Zinzani, P.L., Pileri, S.A., Malik, F., Macon, W.R., Goy, A., Witzig, T.E., and Czuczman, M.S. (2011). Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. Cancer *117*, 5058-5066.

337. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01197560.

338. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01855750.

339. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01402440.

340. Friedberg, J.W., Sharman, J., Sweetenham, J., Johnston, P.B., Vose, J.M., Lacasce, A., Schaefer-Cutillo, J., De Vos, S., Sinha, R., Leonard, J.P., et al. (2010). Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Blood *115*, 2578-2585.

341. [online], U.N.L.o.M.C.g. (2015). http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01431209

342. Younes, A., Romaguera, J., Fanale, M., McLaughlin, P., Hagemeister, F., Copeland, A., Neelapu, S., Kwak, L., Shah, J., de Castro Faria, S., et al. (2012). Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *30*, 4161-4167.

343. Roschewski, M., Staudt, L.M., and Wilson, W.H. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. Nature reviews. Clinical oncology *11*, 12-23.

344. Shaffer, A.L., 3rd, Young, R.M., and Staudt, L.M. (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. Annual review of immunology *30*, 565-610.

345. Dubois, S.M., Alexia, C., Wu, Y., Leclair, H.M., Leveau, C., Schol, E., Fest, T., Tarte, K., Chen, Z.J., Gavard, J., et al. (2014). A catalytic-independent role for the LUBAC in NF-kappaB activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells. Blood *123*, 2199-2203.

346. Beyaert, R. (2014). An E3 ubiquitin ligase-independent role of LUBAC. Blood *123*, 2131-2133.

347. Paul, S., and Schaefer, B.C. (2013). A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor-kappaB. Trends in immunology *34*, 269-281.

348. Schmukle, A.C., and Walczak, H. (2012). No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF-kappaB activity. Journal of cell science *125*, 549-559.

349. Soucy, T.A., Smith, P.G., and Rolfe, M. (2009). Targeting NEDD8-activated cullin-RING ligases for the treatment of cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 3912-3916.

350. Teoh, P.J., and Chng, W.J. (2014). p53 abnormalities and potential therapeutic targeting in multiple myeloma. BioMed research international *2014*, 717919.

351. Inn, K.S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.Y., Iwai, K., and Jung, J.U. (2011). Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. Molecular cell *41*, 354-365.

352. Yang, Y., Schmitz, R., Mitala, J., Whiting, A., Xiao, W., Ceribelli, M., Wright, G.W., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., et al. (2014). Essential role of the linear ubiquitin chain assembly complex in lymphoma revealed by rare germline polymorphisms. Cancer discovery *4*, 480-493.

353. Au-Yeung, B.B., Levin, S.E., Zhang, C., Hsu, L.Y., Cheng, D.A., Killeen, N., Shokat, K.M., and Weiss, A. (2010). A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity. Nature immunology *11*, 1085-1092.

354. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., and Nureki, O. (2012). Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-kappaB regulation. The EMBO journal *31*, 3856-3870.

355. Zhang, M., Tian, Y., Wang, R.P., Gao, D., Zhang, Y., Diao, F.C., Chen, D.Y., Zhai, Z.H., and Shu, H.B. (2008). Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. Cell research *18*, 1096-1104.

356. Rodgers, M.A., Bowman, J.W., Fujita, H., Orazio, N., Shi, M., Liang, Q., Amatya, R., Kelly, T.J., Iwai, K., Ting, J., et al. (2014). The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. The Journal of experimental medicine *211*, 1333-1347.

357. Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., and Kim, E. (2001). Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. Molecular and cellular neurosciences *17*, 385-397.

358. Rantala, J.K., Pouwels, J., Pellinen, T., Veltel, S., Laasola, P., Mattila, E., Potter, C.S., Duffy, T., Sundberg, J.P., Kallioniemi, O., et al. (2011). SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation. Nature cell biology *13*, 1315-1324.

359. Lim, K.H., Yang, Y., and Staudt, L.M. (2012). Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. Immunological reviews *246*, 359-378.

360. Sakamoto, H., Egashira, S., Saito, N., Kirisako, T., Miller, S., Sasaki, Y., Matsumoto, T., Shimonishi, M., Komatsu, T., Terai, T., et al. (2015). Gliotoxin Suppresses NF-kappaB Activation by Selectively Inhibiting Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC). ACS chemical biology *10*, 675-681.

361. Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et biophysica acta *1830*, 3670-3695.

362. David, B. (2011). Industrie pharmaceutique et substances naturelles. lecture - université Paris 6.

363. Mathews Griner, L.A., Guha, R., Shinn, P., Young, R.M., Keller, J.M., Liu, D., Goldlust, I.S., Yasgar, A., McKnight, C., Boxer, M.B., et al. (2014). High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 2349-2354.

364. Hailfinger, S., Lenz, G., and Thome, M. (2014). Targeting B-cell lymphomas with inhibitors of the MALT1 paracaspase. Current opinion in chemical biology *23*, 47-55.

365. Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T., and Avots, A. (2000). The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. Biochimica et biophysica acta *1498*, 1-18.

366. Nayak, A., Glockner-Pagel, J., Vaeth, M., Schumann, J.E., Buttmann, M., Bopp, T., Schmitt, E., Serfling, E., and Berberich-Siebelt, F. (2009). Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. The Journal of biological chemistry *284*, 10935-10946.

367. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. Genes & development *17*, 2205-2232.

368. Muhammad, K., Alrefai, H., Marienfeld, R., Pham, D.A., Murti, K., Patra, A.K., Avots, A., Bukur, V., Sahin, U., Kondo, E., et al. (2014). NF-kappaB factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. European journal of immunology *44*, 3392-3402.

369. Bhattacharyya, S., Deb, J., Patra, A.K., Thuy Pham, D.A., Chen, W., Vaeth, M., Berberich-Siebelt, F., Klein-Hessling, S., Lamperti, E.D., Reifenberg, K., et al. (2011). NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. The Journal of experimental medicine *208*, 823-839.

370. Quah, B.J., Warren, H.S., and Parish, C.R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nature protocols *2*, 2049-2056.