HAL
open science

Physiopathologie du lymphome à cellules du manteau : de la mécanistique aux modèles précliniques

Simon Body

To cite this version:

Simon Body. Physiopathologie du lymphome à cellules du manteau : de la mécanistique aux modèles précliniques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC419 . tel-01768551

HAL Id: tel-01768551

https://theses.hal.science/tel-01768551v1

Submitted on 17 Apr 2018

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.

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'université de Caen Normandie

Titre de la thèse :

Physiopathologie du lymphome à cellules du manteau : de la mécanistique aux modèles précliniques

Présentée et soutenue par

Simon BODY

Thèse soutenue publiquement le 29/11/2017 devant le jury composé de		
Mme VARIN-BLANCK Nadine	Directeur de Recherche INSERM / Université de Paris 13	Rapporteur
M. BROCCARDO Cyril	Chargé de Recherche INSERM, HDR / Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
M. DALLEMAGNE Patrick	Professeur des universités / Université de Caen Normandie	Examinateur
M. MAYEUX Patrick	Directeur de Recherche CNRS / Université Paris Descartes	Examinateur
Mme SOLA Brigitte	Directeur de Recherche CNRS / Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Brigitte SOLA

Titre : Physiopathologie du lymphome à cellules du manteau : de la mécanistique aux modèles précliniques

Mots clés : lymphome à cellules du manteau, cycline D1, modèles *in vivo*, agonistes aux récepteurs β des œstrogènes (ERβ), inhibiteur d'*exportin 1* (XPO1), potentiel métastatique, chimiorésistance, *fused in sarcoma* (FUS).

Résumé :

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est une hémopathie maligne B mature, appartenant à la famille des lymphomes non hodgkiniens. Le LCM est caractérisé par la translocation t(11;14)(q13;q32) qui provoque une expression aberrante de cycline D1. C'est une pathologie rare mais à haut risque de rechute, et qui reste le plus souvent incurable suite à l'apparition de clones chimiorésistants. L'acquisition de résistance est intimement liée aux interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Afin de mimer de la manière la plus pertinente possible ces interactions, nous avons mis en place un modèle murin de xénogreffe en utilisant les lignées cellulaires de LCM JeKo1, REC1, Z138 et Granta-519 que nous avons modifiées afin qu'elles expriment un fluorophore (GFP ou m-cherry) et/ou le gène codant pour la luciférase. Après injection aux souris du substrat de la luciférase, la luciférine, nous sommes en mesure de suivre au cours du temps la progression tumorale. Nous pouvons également évaluer le degré d'infiltration tumorale dans la moelle osseuse, la rate, le cerveau et le sang après euthanasie des animaux, par des techniques de cytométrie en flux et d'immunocytochimie. Ce modèle nous a permis de montrer l'intérêt thérapeutique d'un inhibiteur de l'exportine 1 (XPO1) : le KPT 330 (ou selinexor) qui est capable de contenir cycline D1 uniquement au niveau nucléaire. Nous avons montré que la localisation subcellulaire de cycline D1, est retrouvée majoritairement cytoplasmique dans certaines lignées cellulaires de LCM (2/7) et chez un certain nombre de patients (6/42, 14%), et est associée à un fort potentiel d'invasion, de migration et à un phénotype agressif. Par ailleurs, grâce à ce modèle, nous avons pu objectiver le manque d'efficacité *in vivo* d'agonistes aux récepteurs aux œstrogènes de type β (ER β). Ces récepteurs, présents sur les lymphocytes B étaient supposés inhiber la prolifération

cellulaire et provoquer la mort des cellules par apoptose. L'utilisation de deux agonistes des ER β, le diarylpropionitrile (DPN) et l'ERB-041 a montré une absence d'effet de ces molécules, lorsque les cellules tumorales sont au contact de leur microenvironnement. D'autre part, afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux chimiothérapies, nous avons étudié la résistance de la lignée cellulaire REC-1 traitée par des agents génotoxiques. Nous avons montré que cette lignée présentait une anomalie de dégradation de cycline D1 associée à une activité diminuée du protéasome 26S. Enfin, nous avons montré dans des travaux préliminaires que la protéine *fused in sarcoma* (FUS) pourrait, lorsqu'elle est associée à cycline D1, être capable de réguler les voies de réparation des dommages à l'ADN. Des anomalies de ces voies induisent une grande instabilité génétique responsable de l'échappement des tumeurs aux traitements, le ciblage de FUS pourrait par conséquent présenter un intérêt thérapeutique.

Pris dans leur ensemble, ces résultats permettent de renforcer ou d'infirmer l'intérêt de certaines cibles thérapeutiques dans l'espoir de pouvoir continuer à améliorer la prise en charge des patients. Ils fournissent également un outil pour l'évaluation de nouvelles molécules dans un modèle murin prenant en compte les interactions entre la cellule tumorale et son microenvironnement.

Title: Physiopathology of mantle cell lymphoma from mechanistic to preclinical models

Keywords: Mantle cell lymphoma, cyclin D1, *in vivo* models, estrogen receptor β agonists, exportin 1 inhibitor (XPO1), metastatic potential, chemoresistance, fused in sarcoma (FUS).

Abstract:

Mantle cell lymphoma (MCL) is a mature malignant hemopathy, belonging to the non-Hodgkin's lymphoma family. The MCL is characterized by the translocation t(11;14)(q13;q32) which causes an aberrant expression of cyclin D1. It is a rare disease but at high risk of relapse, and it is most often incurable due to the appearance of chemoresistant clones. The acquisition of resistance is intimately linked to the interactions between the tumor cells and their microenvironment. In order to mimic, in the most relevant way, these interactions, we have implemented a mouse xenograft model using the MCL cell lines JeKo1, REC1, Z138 and Granta-519 which we have modified so that they express a fluorophore (GFP or m-cherry) and / or the gene encoding the luciferase. After injection to the mice of the luciferase substrate, luciferin, we are able to follow over time the tumor progression. We can also assess the degree of tumor infiltration in bone marrow, spleen, brain and blood after euthanasia of animals, by flow cytometry and immunocytochemistry. This model allowed us to show the therapeutic interest of an inhibitor of exportin 1 (XPO1): the KPT 330 (or selinexor) which is able to contain cyclin D1 only on the nuclear level. We have shown that the subcellular localization of cyclin D1 is mainly cytoplasmic in some LCM (2/7) cell lines and in a number of patients (6/42, 14%), and is associated with a high potential Invasion, migration and an aggressive phenotype. Moreover, thanks to this model, we have been able to objectify the in vivo lack of efficacy of agonists to β-type estrogen receptors (ER β). These receptors, present on B lymphocytes, were thought to inhibit cell proliferation and cause cell death by apoptosis. The use of two ER β agonists, diarylpropionitrile (DPN) and ERB-041 showed an absence of effect of these molecules, when the tumor cells are in contact with their microenvironment. On the other hand, in order to better understand the mechanisms of resistance to chemotherapies, we studied the resistance

of the REC-1 cell line treated with genotoxic agents. We have shown that this line has an abnormality of cyclin D1 degradation associated with decreased activity of the 26S proteasome. Finally, we have shown in preliminary work that the fused in sarcoma protein (FUS) could, when associated with cyclin D1, be able to regulate the repair pathways of DNA damage. Abnormalities of these pathways induce a great genetic instability responsible for the escape of tumors to treatments, the targeting of FUS could therefore be of therapeutic interest.

Taken as a whole, these results reinforce or invalidate the interest of certain therapeutic targets in the hope of continuing to improve the management of patients. They also provide a tool for evaluating new molecules in a murine model that takes into account the interactions between the tumor cell and its microenvironment.

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier les Dr Nadine Varin-Blank, Cyril Broccardo d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse de science. Je remercie également le Pr. Patrick Dallemagne et le Dr Patrick Mayeux d'avoir accepté d'être membres de ce jury.

Arrivant désormais à la fin de mes études, c'est avec un regard ému que je regarde ces dix dernières années passées dans mon cursus de pharmacie.

Ce troisième cycle d'étude commencé il y a 5 ans, m'a fait atterrir en Normandie, dans la belle ville de Caen, suite à une contre performance de ma part lors de mon concours de l'internat. Un mauvais diagnostic sur un sujet de toxicologie, pourtant évident et les points se sont envolés, me faisant arriver loin sur la liste complémentaire, n'ayant aucune certitude sur mon avenir jusqu'au dernier moment de la commission de répartition. Au final j'ai obtenu mon poste, loupant cependant l'inter-région Grand Ouest d'où je suis originaire à une place prêt ! Me voilà donc en Normandie à Vire pendant un an tout d'abord puis avec toi Brigitte pour mon master 2 puis ma thèse. Avec le recul, ces épreuves et ce dépaysement forcé ont été la meilleure chose qui puisse m'arriver. En effet, je n'aurais pas pu espérer un meilleur encadrant que toi Brigitte ! Tout d'abord par ton niveau scientifique et organisationnel que je trouve absolument irréprochable, ensuite pour l'excellente ambiance de travail que tu sais entretenir avec tes collègues. Mais aussi pour la façon dont tu manages ton équipe laissant une grande liberté individuelle tout en posant un cadre pour prévenir toute sortie de piste, pour la façon dont tu t'es personnellement occupée de moi, toujours extrêmement disponible, pour la façon dont tu as su me recadrer quelques fois, me disant exactement ce que j'avais besoin d'entendre au moment où j'avais besoin de l'entendre. Pour en avoir discuté avec Gaël, je sais combien ça nous aura été utile et nécessaire. Je tiens donc à te remercier du fond du cœur pour ces 4 belles années passées ensemble !

Je tiens bien évidement à remercier le Pr Troussard qui m'a permis de rencontrer Brigitte Sola, ainsi que le Pr. Ifrah qui m'a mis en contact avec le Pr Troussard.

Je tiens à faire un grand merci à mes collègues et tous ceux avec qui j'ai travaillé.

Anne merci pour tous tes précieux conseils techniques ainsi que pour ta rigueur qui contribue à rendre ce laboratoire toujours aussi bien organisé.

Hadjer, c'est avec grand plaisir que je t'ai vu arriver au labo quand tu n'étais qu'en master 1, te voilà en thèse maintenant je te souhaite donc bon courage. Merci d'avoir toujours été là pour me donner un coup de main.

Gaël, c'est avec un immense plaisir que je suis venu travailler dans ton laboratoire à Barcelone pendant 2 mois, j'en garde un excellent souvenir tant scientifique qu'humain, merci pour tout.

Khaoula et Elsa, partager le même bureau crée obligatoirement des liens particuliers, merci à vous deux pour ces moments de camaraderie.

Elodie, bon courage pour ta thèse à venir, je suis content que tu aies obtenue une bourse, tu la mérites.

Je tiens également à remercier tous ceux que j'ai pu côtoyer durant mon internat Maëlle, Clémence, Martin, Nathan, Nicolas ainsi que toute l'équipe de l'IDIBAPS.

Je tiens à remercier aussi bien évidement l'ensemble des membres de l'unité UMR 1245 à commencer par le responsable de notre équipe, le Pr Jardin et aussi le Pr. Damaj et le Dr Cornet.

Ces années en Normandie et à Angers n'auraient pas été aussi savoureuses sans vous les amis :

Toi ma chérie, que j'ai rencontrée il y a 2 ans maintenant sur ce terrain de badminton et qui m'a soutenu et encouragé depuis tout ce temps. Tu es ma meilleure supportrice. Je t'aime.

Vous la fine équipe, la garde rapprochée des « O B » Quentin, Victor, Louis, Camille, Hugo.

Quentin, merci pour toutes ces rigolades, ces discussions passionnées et cette complicité, au passage, tu passeras mes hommages à Didier.

Victor, félicitations pour ton prochain mariage et bon courage pour ta thèse, je sais que tu la soutiens bientôt.

Louis, quand tu es parti à Rouen j'ai perdu mon meilleur co-DJ !

Camille, merci pour tous ces bons moments.

Hugo, tu auras pris la relève de Louis avec panache !

Je tiens également à remercier toute ma tribu angevine, qui a donné un goût si agréable à mes 5 premières années de pharmacie, vous êtes ma deuxième famille !

Parce ce que je ne serais pas là où je suis aujourd'hui sans vous, un grand merci à ma famille.

Papa, Maman, merci d'avoir toujours été là pour me soutenir, pour m'aider, pour m'encourager, pour me conseiller, pour me motiver, pour me pousser à donner le meilleur de moi. Je sais que vous êtes très fiers de moi, mais sachez que je suis moi aussi très fier de vous, et que vous êtes vraiment des supers parents.

Noémie, tu as toujours été un modèle pour moi, c'est donc dans tes pas, que je soutiens à mon tour mon doctorat. J'espère faire aussi bien que toi.

Liste des abréviations

^{18}F-FLT	^{18}F-3'-Fluoro-3'-déoxythymidine
ADN	acide désoxyribonucléique
AMM	autorisation de mise sur le marché
AMP	adenosine mono-phosphate
AMPK	*AMP activated protein kinase*
APC	*adenomatous polyposis coli*
ARNm	acide ribonucléique messager
ASMR	amélioration du service médical rendu
ATM	*ataxia telangiectasia mutated*
ATM	*ataxia telangiectasia mutated*
ATR	*ATM and Rad3-related*
BAFF	*B-cell activating factor*
BCR	*B-cell receptor*
BRCA1 ou 2	*breast cancer 1* ou *2*
BTK	*Bruton tyrosine kinase*
CAM-DR	*cell adhesion-mediated drug resistance*
CDK	*cyclin-dependent kinase*
CDKN2A	*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
ChIP	*chromatin immunoprecipitation*
CMF	cytométrie en flux
CSP	cellules souches de patient
CXCR4	*C-X-C chemokine receptor type 4*
DDR	*DNA damage response*
DPN	diarylpropionitrile
DSB	double strand break
DYRK1B	*dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B*

ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
ERB-041	2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-7-vinyl-1,3-benzoxazol-5-ol
ERα/β	*estrogen receptor* α/β
FISH	*fluorescence in situ hybridization*
FOXO	*Forkhead box O*
FUS/TLS	*fused in sarcoma / translocated in liposarcoma*
GBR7	*growth factor receptor-bound protein 7*
GCN5	*general control non-repressed protein 5*
GSK3β	*glycogen synthase kinase* 3β
HDR	*homology direct repair*
HK2	hexokinase 2
HSC	*hematopoietic stem cell*
HSP	*heat shock protein*
ICT	irradiation corporelle totale
Ig	immunoglobuline
IGH	chaine lourde des Ig
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
KO	*knock-out*
LB	lymphocyte B
LCM	lymphome à cellules du manteau
LDH	lactate déshydrogénase
LEF 1	*lymphoid enhancer binding 1*
LF	lymphome folliculaire
LH	lymphome de Hodgkin
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LNH	lymphome non hodgkinien
LT	lymphocytes T

MALT	tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MDM2	*murine double minute 2*
MEC	mammary epithelial cells
MET	microenvironnement tumoral
MIPI	Index international de pronostic du LCM
MRD	maladie résiduelle détectable
MRN	complexe MRE11-RAD50-NBS1
NES	*nuclear export signal*
NF-kB	*nuclear factor-κB*
NHEJ	*non homologous end joining*
NK	*natural killer*
NPC	*nuclear pore complex*
NSG	*non obese diabetic SCID IL2Rγ^{null}*
OMS	organisation mondiale de la santé
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PDGFA	*platelet derived growth factor subunit A*
PDX	*patient-derived xenograft*
PEST	Séquence de cycline D1 riche en proline, acide glutamique, serine (S) et thréonine
PET	*positron emission tomography*
PGC-1α	*peroxisome-proliferator-activated receptor 1 α*
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PMBC	*peripheral mononuclear blood cell*
PNK	*polynucleotide kinase*
PNN	polynucléaires neutrophiles
PPARγ	*peroxisome proliferator-activated receptor γ*
PTEN	*phosphatase and TENsin homolog*
RanGTP	*Ras related nuclear protein*
RB1	protéine du rétinoblastome

RC	réponse complète
RCC1	*regulator of chromosome condensation 1*
RCP	réunion de concertation pluridisciplinaire
REAL	classification européo-américaine révisée
RH	recombinaison homologue
RQ-PCR	*reverse transcription real time-quantitative PCR*
SCID	*severe combined immunodeficiency*
SDF1	*stromal derived factor 1* ou CXCL12
SINE	*selective inhibitor of nuclear export*
SMR	service médical rendu
SOX11	*sex-determining region Y, box 11*
SSL	lymphome à petit lymphocytes
SSP	survie sans progression
TCF	*T Cell Factor*
TGFβ	*transforming growth factor β*
Thr286	Thréonine en position 286
TNF-α	*tumor necrosis factor-α*
U2 AF65	*U2 small auxiliary factor 65*
UTR	*untranslated region*
VDAC	*voltage-dependent anion channel*
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
Wnt	*Wingless integration site*
XPO1	*exportin 1*
XRCC4	*X-ray repair cross-complementing protein 4*

Table des matières

Remerciements VIII
Liste des abréviations XI
Table des matières XV
Préambule 1
Introduction 3
A. Le lymphome à cellules du manteau 3
I. Epidémiologie et définitions 3
1. Hémopathies malignes 3
2. Lymphomes non-hodgkiniens 4
2.1. La rate 5
2.2. Les ganglions lymphatiques 6
2.3. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses 7
3. Lymphome à cellules du manteau 8
II. Diagnostic et pronostic 9
1. Clinique 9
1.1. Présentation ganglionnaire 9
1.2. Autres organes hématopoïétiques 10
1.3. Localisations viscérale 10
2. Critères histologique et cytologique 10
3. Critères immuno-histochimique et moléculaire 11
4. Etude cytogénétique 13
5. Score pronostique 13
III. Mécanismes physiopathologiques connus du LCM 15
1. Translocation t(11;14)(q13;q32) et surexpression de cycline D1 15
2. Altérations génétiques secondaires 16
2.1. Mutations géniques 16
2.2. Voies de signalisation dérégulées 19
3. Importance du micro-environnement 20
IV. Stratégies thérapeutiques 22
1. Stratégie en première ligne pour les patients jeunes de moins de 65 ans 22
1.1. Conditionnement 22
1.2. Intensification 24
1.3. Maintenance 26

2. Alternatives chez le patient jeune en cas de non réponse au traitement R-DHAC. 26

2.1. Protocole R-CHOP : 27
2.2. Protocole R-BAC 28
2.3. Inhibiteurs du protéasome 28
2.4. Immunomodulateur : le lénalidomide 29
2.5. Inhibiteurs de tyrosine kinase 29

3. Stratégie thérapeutique de première ligne pour les patients de plus de 65 ans 31
4. Alternatives chez le patient âgé réfractaire de plus de 65 ans. 32

4.1. Le temsirolimus 32
4.2. Le lénalidomide 33
4.3. L'ibrutinib 33

5. Stratégies thérapeutique en cours de développement 33

5.1. Essai « RHAD » 33
5.2. Essai « MCL R2 ederly » 33

6. Nouvelles molécules 34

6.1. L'obinutuzumab 34
6.2. Le vénétoclax 34
6.3. L'idélalisib 34

7. Suivi de la maladie résiduelle 35

B. Les modèles d'étude du lymphome à cellules du manteau 36

I. Les modèles d'études *in vitro* 36

1. Les lignées cellulaires de LCM 36

1.1. Granta519 36
1.2. JeKo1 37
1.3. JVM2 37
1.4. Mino 37
1.5. NCEB1 37
1.6. REC1 38
1.7. Z138 38

2. Culture de cellules primaires de patients, méthodes *ex vivo* 39

II. Les modèles d'étude *in vivo* 39

1. Xénogreffes sous-cutanées 39
2. Xénogreffes après injections i.p. 40
3. Xénogreffes après injection i.v. 40
4. Xénogreffes de cellules primaires de LCM 40

C. Récepteurs aux œstrogènes 41

I. Les œstrogènes 41
II. Les récepteurs aux œstrogènes 42
III. Le récepteur α aux œstrogènes 44
IV. Le récepteur β aux œstrogènes 45
V. Les ER dans la lymphopoïèse 46
VI. Les agonistes de ERβ 46

D. Rôles physiologiques et oncogéniques de cycline D1 48

I. Structure et régulation de cycline D1 48

1. Structure du gène 48
2. Structure de l'ARN messager 49
3. Structure de la protéine 50
4. Localisation subcellulaire 51

4.1. Import nucléaire 51
4.2. Exportation cytoplasmique et rôle d'XPO1 51
4.3. Différences de localisation en fonction du sous type de cycline D1 53

5. Régulation de l'expression de cycline D1 53

5.1. Régulation au niveau transcriptionnel 53
5.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel 55
5.3. Régulation de la dégradation 56

II. Fonctions physiologiques de la cycline D1 61

1. En association avec CDK4/6 61

1.1. Contrôle du cycle cellulaire 61
1.2. Contrôle du métabolisme 61
1.3. Contrôle de la différenciation 61
1.4. Contrôle de la sénescence 62

2. Indépendamment de CDK4/6 62

2.1. Contrôle de la réparation de l'ADN 62
2.2. Contrôle de la transcription 63
2.3. Métabolisme des lipides 63
2.4. Respiration mitochondriale 63

III. Rôles oncogéniques de cycline D1 64

1. Dérégulation du cycle cellulaire 65
2. Induction d'une instabilité génomique 65

2.1. Inhibition d'une réparation de qualité 66
2.2. Rôle transcriptionnel 67
2.3. Rôle direct de cycline D1 dans l'instabilité génomique 67

3. Migration cellulaire 69
4. Contrôle de la stabilité chromosomique 69
5. Régulation de l'apoptose mitochondriale 70

6. Inhibition de l'autophagie 70
7. Inhibition de l'anoïkis 71

IV. Rôles oncogéniques de cycline D1 dans le LCM 71

1. Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération 71
2. Séquestration de BAX et contrôle de l'apoptose 72

Objectifs de mon projet de thèse 73
Résultats 75
A. Mise en place d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* pour le LCM 75

I. Protocoles 76

1. Transduction des lignées Granta519 et Z138 par des rétrovirus afin d'obtenir des cellules GFP-Luc 76

1.1. Production des particules rétrovirales 76
1.2. Transduction des cellules 77
1.3. Tri des cellules 77

2. Autres lignées cellulaires de MCL modifiées et utilisées dans nos expériences 77

II. Xénogreffe des lignées de LCM exprimant GFP-Luc dans des souris immunodéprimées. 79

1. Injections des lignées de LCM 79
2. Suivi de la croissance tumorale 79
3. Mise à mort des animaux 80
4. Analyse des organes infiltrés 80

III. Evaluation du modèle 81

1. Efficacité de production des lignées GFP-Luc 81
2. Suivi des animaux 83
3. Suivi de la xénogreffe 84
4. Analyses post-mortem 88
5. Comparaison des lignées et des souches murines 90

B. Les agonistes aux ERβ n'ont pas d'effet *in vitro* et *in vivo* sur les cellules de lymphome du manteau 93
C. La forme cytoplasmique de cycline D1 contrôle la migration et l'invasion des cellules de LCM 109
D. Une diminution de l'activité du protéasome 26S est responsable de la résistance aux stress génotoxiques 118
E. Recherche de nouveaux partenaires à la cycline D1 : 120

I. La protéine FUS 120
II. Voies de réparation des dommages à l'ADN 122
III. Résultats préliminaires 124

1. Données de protéomique 124

2. FUS est exprimée dans les lignées de LCM et de MM 125
3. Colocalisation cycline D1 / FUS 126
4. FUS et CDK4 ne sont pas colocalisés dans les cellules de LCM et de MM.....128
5. FUS / γH2AX sont colocalisées à la suite d'un stress génotoxique 128
6. Réponse des cellules à un traitement à l'étoposide : 130

IV. Perspectives 132

Discussion 134
A. Les modèles in vivo de lymphome à cellules du manteau 134
B. Les agonistes aux ERβ n'ont pas d'effet in vitro et in vivo sur les cellules de lymphome du manteau 135
C. Le nouveau role de la forme cytoplasmique de cycline D1 137
D. Une diminution de l'activité du protéasome 26S est responsable de la résistance aux stress génotoxiques 143
E. Les dimères FUS/cycline D1 pourraient jouer un rôle dans la réparation des cassures de l'ADN 146
Conclusion 149
Bibliographie 151
Annexe 1 162
Annexe 2 163
Annexe 3 164

Préambule

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est une pathologie rare qui présente désormais un pronostic de survie intermédiaire grâce aux progrès de ces dernières années. Après une première ligne de traitement efficace, il est fréquent de voir une rechute causée par la sélection de clones tumoraux résistants aux chimiothérapies. C'est dans ce contexte, que nous avons souhaité dans ce travail de thèse nous intéresser à : approfondir les connaissances physiopathologiques de la maladie, évaluer l'activité de nouvelles drogues, ainsi que rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Une première partie introductive s'attèlera à décrire la pathologie, la place de celle-ci dans les cancers hématologiques puis dans les lymphomes non-hodgkiniens. Les différentes étapes du diagnostic, de la clinique à la cytogénétique en passant par la biologie moléculaire et l'histologie seront décrites. Les différentes étapes oncogéniques de la physiopathologie des LCM seront détaillées, de la translocation initiatrice jusqu'à l'acquisition de mutations secondaires. Enfin les différents protocoles thérapeutiques ainsi que les mécanismes d'actions des molécules qui leur sont associés seront exposés.

L'ensemble des résultats obtenus durant ce travail de thèse seront décrits dans cinq chapitres. Un premier traitera des modèles d'études de la pathologie *in vivo*, et des modèles de xénogreffes chez la souris que nous avons mis en place en utilisant des lignées cellulaires exprimant une protéine fluorescente et la luciférase. Ces modèles ont permis un suivi hebdomadaire de la croissance tumorale ainsi qu'une quantification de l'infiltrat tumoral. Un deuxième chapitre traitera de l'utilisation de ces modèles pour évaluer l'activité thérapeutique d'agonistes aux récepteurs β des œstrogènes *via* l'utilisation de deux molécules : le diarylpropionitrile (DPN) et le 2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-7-vinyl-1,3-benzoxazol-5-ol (ERB-041). Une description des différents rôles oncogéniques de cycline D1 introduira le troisième chapitre. Puis nous présenterons les résultats d'une étude sur l'importance de la localisation subcellulaire de cycline D1 dans la régulation des propriétés invasives des cellules *in vivo* et *in*

vitro et dans une plus grande agressivité de la pathologie chez les patients. Dans un quatrième chapitre, nous décrirons la régulation de la dégradation de cycline D1 et nos résultats concernant l'acquisition d'un phénotype de résistance au stress génotoxique dans une lignée de LCM. Une cinquième partie reprendra des travaux préliminaires sur le rôle de cycline D1 dans la régulation des dommages à l'ADN lorsqu'elle se retrouve associée à la protéine FUS.

Enfin dans une dernière partie, nous discuterons des enjeux, des limites et des perspectives de ce travail de thèse.

Introduction

A. Le lymphome à cellules du manteau

I. Epidémiologie et définitions

1. Hémopathies malignes

En France métropolitaine, 385 000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année. Parmi eux, on dénombre 35 000 nouveaux cas d'hémopathies malignes soit environ 10% des nouveaux cas de cancer. Plus de la moitié de ces cas surviennent après l'âge de 60 ans avec un *sex-ratio* en défaveur des hommes : 19 400 contre 15 600 nouveaux cas (1). Les hémopathies malignes rassemblent un grand nombre de pathologies différentes, aussi bien au niveau biologique que clinique et pronostique. Le dénominateur commun des hémopathies malignes est que les cellules tumorales sont toutes issues de la descendance des cellules souches hématopoïétiques (HSC pour *hematopoietic stem cell*) (Figure 1). Afin de classifier cette multitude de pathologie, on les différenciera d'une part en fonction de leur lignage, myéloïde ou lymphoïde ou, d'autre part, selon le stade du blocage de différenciation. Lorsque le blocage de différenciation de la cellule tumorale survient à un stade immature, proche de la HSC, la pathologie est qualifiée d'aiguë. En revanche, lorsque la cellule tumorale se trouve près du stade de la cellule spécialisée circulante mature, la pathologie est qualifiée de chronique.

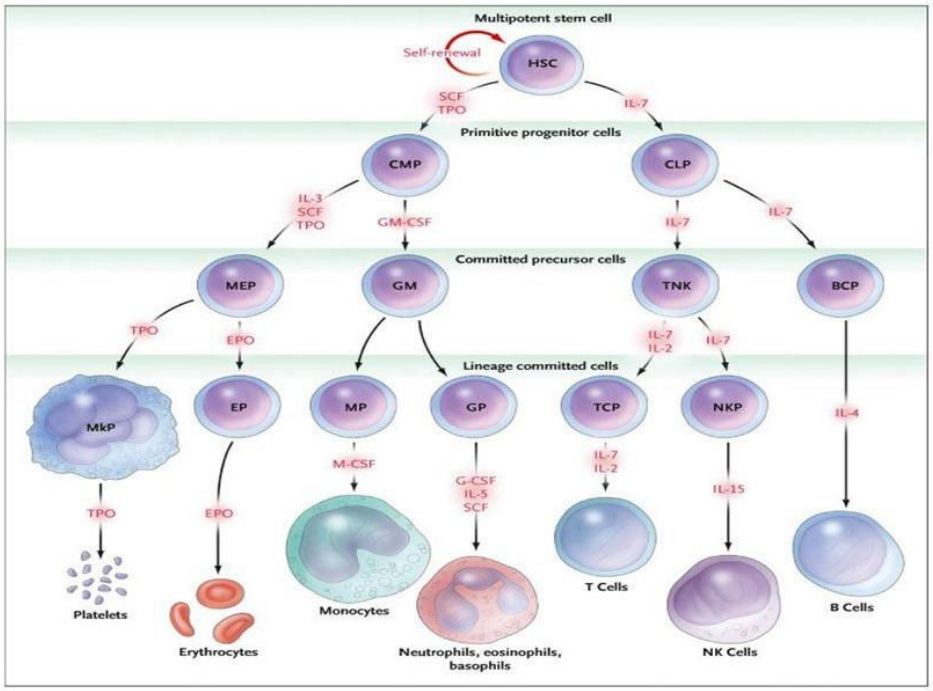


Figure 1 : Hématopoïèse physiologique. Les cellules hématopoïétiques sont toutes issues de la HSC. Celle-ci donne deux lignages différents, le lignage myéloïde produisant plaquettes, érythrocytes, monocytes et polynucléaires ainsi que le lignage lymphoïde produisant les lymphocytes T (LT), les *natural killers* (NK) et les lymphocytes B (LB). D'après (2).

2. Lymphomes non-hodgkiniens

Les lymphomes non-hodgkiniens (LNH) bien que présentant des caractéristiques communes regroupent un ensemble hétérogène de plus de 70 types et sous-types de pathologies différentes. Ils sont caractérisés par une prolifération maligne monoclonale de cellules lymphoïdes B ou T, rarement NK, ayant pour origine les organes lymphoïdes secondaires et envahissant secondairement les viscères, la moelle et le sang. En 2010, en France, environ 10 800 nouveau cas ont été diagnostiqués. Les LNH représentent ainsi 3% de l'ensemble des cancers et se situent au 7ème rang des cancers les plus fréquents chez la femme et au 6ème rang chez l'homme. L'incidence augmente notablement après l'âge de 65 ans, mais les LNH peuvent survenir à tout âge, y compris chez l'enfant (lymphome de Burkitt, lymphome lymphocytique). Le pronostic global est très variable selon les différentes formes histologiques, 3 700 décès annuels sont recensés dont 54% chez l'homme soit 2.5% des décès par cancer (3,4).

Les LNH regroupent un ensemble de pathologies qui se distinguent du lymphome de Hodgkin (LH) pour des raisons historiques. Le LH fut le premier lymphome décrit sur des critères anatomopathologiques (présence des cellules de Reed-Sternberg) et cliniques (meilleur pronostic pour le LH).

Parmi les LNH, on distingue :

- des hémopathies B matures, comprenant entre autre le lymphome diffus à grande cellules (LBGC), le lymphome folliculaire (LF), le lymphome de Burkitt et le lymphome à cellules du manteau (LCM) ;
- des hémopathies immatures comme le lymphome lymphoblastique B ou T ;
- des hémopathies T matures plus rares : le lymphome T sous-cutané, le lymphome T/NK extranodal.

Bien que les LNH soient souvent diagnostiqués à un stade tumoral avancé avec envahissement des viscères, de la moelle et du sang, le foyer tumoral initial de ces pathologies se situe dans les organes lymphoïdes secondaires, cela constitue le dénominateur commun de l'ensemble des lymphomes.

Afin de mieux appréhender cette pathologie, il convient de faire un bref rappel sur l'ensemble des organes lymphoïdes secondaires. Ceux-ci comprennent : les ganglions lymphatiques, la rate et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Le terme secondaire est utilisé, car ces tissus ne sont pas capables de réaliser la maturation les lymphocytes, qui se déroule, elle dans les organes lymphoïdes primaires (moelle rouge des os longs et thymus). En revanche, ils sont les lieux de concentration des lymphocytes au niveau desquels s'effectue l'activation de la réponse immunitaire adaptative avec la présentation antigénique (5).

2.1. La rate

La rate est un organe abdominal intrapéritonéal situé dans l'hypochondre gauche. Elle est composée de la pulpe rouge qui joue un rôle important dans la régulation de la formation des éléments figurés du sang et principalement des hématies et la de pulpe blanche où se déroulent les rencontres antigènes-lymphocytes. Elle possède un rôle prépondérant dans l'immunité notamment contre les bactéries encapsulées.

2.2. Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont répartis dans tout l'organisme, le plus souvent regroupés en aires ganglionnaires. Ils se situent aux nœuds des vaisseaux du système lymphatique, et ils jouent un rôle de filtre de la circulation lymphatique. C'est là où sont drainés l'ensemble des antigènes des organes irrigués par le système lymphatique (Figure 2). Un ganglion lymphatique est constitué de différentes parties qui se distinguent les unes des autres par leur position dans le ganglion ainsi que par leur contenu cellulaire. La partie la plus interne du ganglion est la zone médullaire, on y trouve notamment des lymphocytes mémoires. Une partie intermédiaire correspond au paracortex riche en lymphocytes T (LT) et cellules dendritiques, c'est dans cette zone que les lymphocytes passent du sang aux ganglions. Enfin la partie la plus externe correspond à la zone corticale.

Dans la zone corticale, les lympocytes B (LB) sont regroupés en structures arrondies appelées follicules primaires, ceux-ci une fois activés par la rencontre avec un antigène prolifèrent et transforment l'architecture du follicule ; celui-ci prend alors le nom de follicule secondaire. Il est composé de :

- un centre germinatif contenant des centroblastes (LB en prolifération et réarrangeant les gènes des immunoglobulines (Ig) et subissant la commutation de classe) et de centrocytes ou LB sélectionnés ayant effectué leur commutation isotypique ;
- la zone du manteau qui entoure le centre germinatif et est composée de LB naïfs semblables à ceux du follicule primaire ;
- la zone marginale, en périphérie du manteau, est le siège de l'immunité spécifique indépendante de l'antigène (LB mémoires).

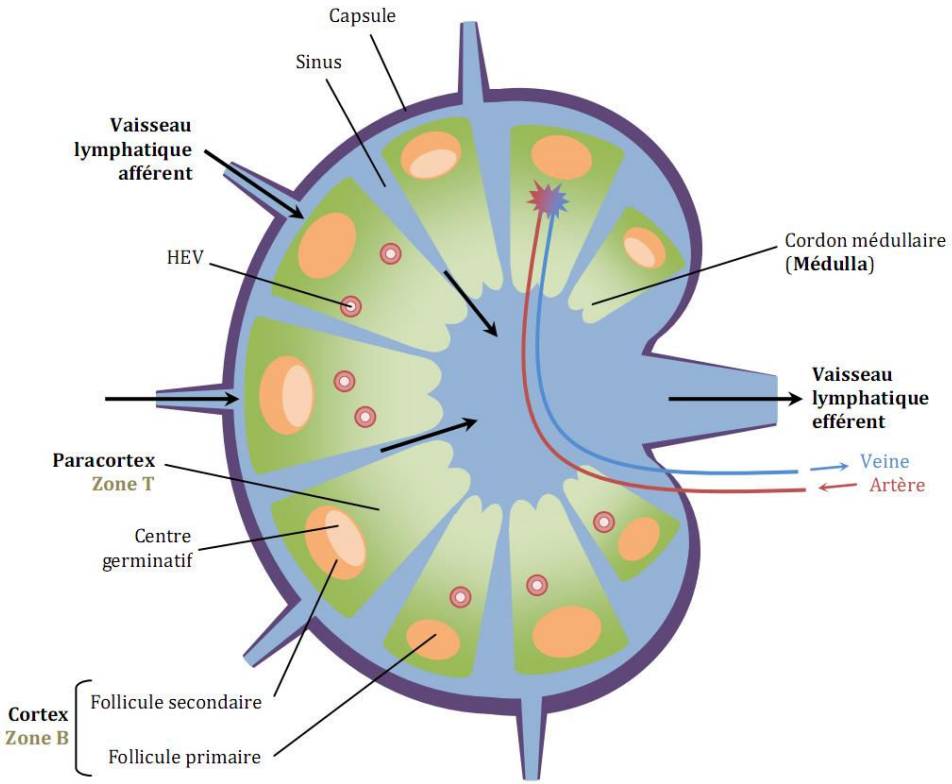


Figure 2 : Structure d'un ganglion. Le ganglion est irrigué par des canaux lymphatiques afférents qui drainent les cellules cancéreuses et dendritiques des tissus jusqu'au niveau des follicules primaires situés dans le cortex. Après stimulation antigénique, le follicule primaire se transforme d'une structure homogène à une structure possédant un centre germinatif, un manteau et une zone marginale : le follicule secondaire.D'après (6).

2.3. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses

Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (ou MALT) est présent de manière diffuse au niveau de toutes les muqueuses de l'organisme. Il est particulièrement abondant au niveau du tube digestif dans des structures que l'on nomme plaques de Peyer et dans une moindre mesure au niveau de la gorge, sur le pourtour du pharynx, dans les amygdales. Il joue un rôle important dans les défenses du système immunitaire de par sa localisation. Il initie une réponse immunitaire spécifique et produit de grande quantité d'Ig de type A (7).

3. Lymphome à cellules du manteau

Le LCM est un sous type de LNH qui touche exclusivement les LB. Il a été classé comme tel en 1994 par la classification européo-américaine révisée (REAL) (8). Il représente 6% des cas de LNH aux Etats Unis (9) et de 7 à 9% en Europe (10). C'est l'hémopathie avec le plus mauvais pronostic. En 2012, 659 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France et l'incidence standardisée sur la population mondiale est de 0.8 et 0.2 pour 100 000 hommes et femmes respectivement (*sex-ratio* de 4:1) avec un âge médian de 74 ans (11). Le point de départ de la tumeur est la zone du manteau du follicule secondaire d'un ganglion d'où la dénomination de LCM. Cette localisation particulière n'est cependant que rarement utile au diagnostic. En effet, dans 90% des cas, cette tumeur est déjà disséminée dès le diagnostic, avec des cellules circulantes, des atteintes médullaires et extranodales (côlon). Cette pathologie reste aujourd'hui majoritairement incurable, les patients rechutant aux traitements après une première bonne réponse (12).

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2008 a dénombré 5 variants morphologiques de LCM aux comportements cliniques divers : la forme classique (≈ 87% des cas), le variant à petites cellules (≈ 4% des cas), le variant blastoïde (≈ 3% des cas) dont les cellules sont plus grosses avec une chromatine dispersée, c'est le variant qui possède les capacités de prolifération les plus importantes et qui est donc associé au moins bon pronostic, le variant pléiomorphe (≈ 6% des cas) et enfin, plus rarement, le variant ressemblant aux lymphomes de la zone marginale (12).

II. Diagnostic et pronostic

Le diagnostic d'un LNH est posé en se référant à la classification consensuelle de Lugano, le sous-typage vient dans un second temps et est objectivé par une étude immunohisto-chimique (présence de cycline D1) et/ou des recherches cytogénétiques et moléculaires éventuelles (13). En se référant à la classification WHO 2008, le diagnostic du LCM est basé sur la morphologie des cellules tumorales et la présence caractéristique de la translocation t(11;14)(q13;q32). Celle-ci juxtapose le gène *CCND1* qui code pour cycline D1 au gène *IGH* codant pour la chaine lourde des Ig, il en résulte une expression constitutive de cycline D1. De rares cas de LCM sont cependant cycline D1 négatif ou présentent une morphologie variante qui peut potentiellement mener à une erreur diagnostique. La plupart des LCM sont disséminés au moment du diagnostic et l'évolution de la pathologie est typiquement caractérisée par des rechutes récurrentes malgré une bonne réponse initiale au traitement. La survie médiane est plus courte que dans la majorité des autres lymphomes B ce qui permet de qualifier la pathologie comme étant agressive. Il existe cependant un certains nombres de patients chez lesquels la pathologie présente un comportement indolent (14).

1. Clinique

1.1. Présentation ganglionnaire

La circonstance de diagnostic la plus fréquente des lymphomes malins, est la découverte d'une masse ganglionnaire. L'adénopathie peut être superficielle ou profonde, unique ou multiple. L'ensemble des territoires ganglionnaires peuvent être atteints, leurs tailles et leurs localisations sont variables. Les adénopathies volumineuses et les plus profondes peuvent être révélées par la présence de divers signes cliniques non spécifiques comme une toux, des douleurs pleurales, un syndrome compressif cave, des douleurs abdominales, ou encore des troubles du transit. Ces dernières peuvent alors être objectivées par une radiographie thoracique ou une échographie abdominale.

1.2. Autres organes hématopoïétiques

Les LNH peuvent être révélés plus rarement par une splénomégalie isolée, une hépatomégalie, une atteinte médullaire isolée avec anémie ou pancytopénie. Pour les formes avancées avec atteinte médullaire et/ou hépatosplénique, les lymphomes malins peuvent être découverts par une altération de l'état général avec amaigrissement, asthénie, fièvre au long cours et syndrome inflammatoire.

1.3. Localisations viscérale

La maladie peut également être révélée par une atteinte viscérale principalement au niveau ORL (hypertrophie des amygdales, obstruction du cavum), au niveau digestif (douleurs épigastriques, troubles du transit), au niveau osseux ou épidural (compression médullaire), ou par une atteinte des autres viscères (cutanées, cérébrales, méningées, gonadiques, pulmonaires, etc.) avec les symptômes afférents (5).

2. Critères histologique et cytologique

Le diagnostic de certitude des LNH est basé sur l'analyse histologique d'une biopsie chirurgicale des ganglions ou du tissu atteint. Histologiquement, le LCM est composé de cellules B matures monomorphiques de taille petite à moyenne avec un contour nucléaire irrégulier ou clivé ressemblant à des centrocytes. La chromatine est très dispersée (immature) et on peut observer des nucléoles discrets, le cytoplasme est pâle et très réduit (12) (Figure 3).

Le variant à petites cellules mime morphologiquement un lymphome lymphocytique avec des cellules de petite taille. Le variant ressemblant au lymphome de la zone marginale possède les même caractéristiques morphologiques que ce dernier et présente cliniquement d'importantes splénomégalies chez plus de 80% des patients (15).

Les variants blastoïdes et pléïomorphes présentent une prolifération tumorale élevée, celle-ci est évaluée par l'index Ki-67 (antigène présent dans les cellules en division). Ces deux variants présentent un pronostic plus sombre que les autres formes de LCM.

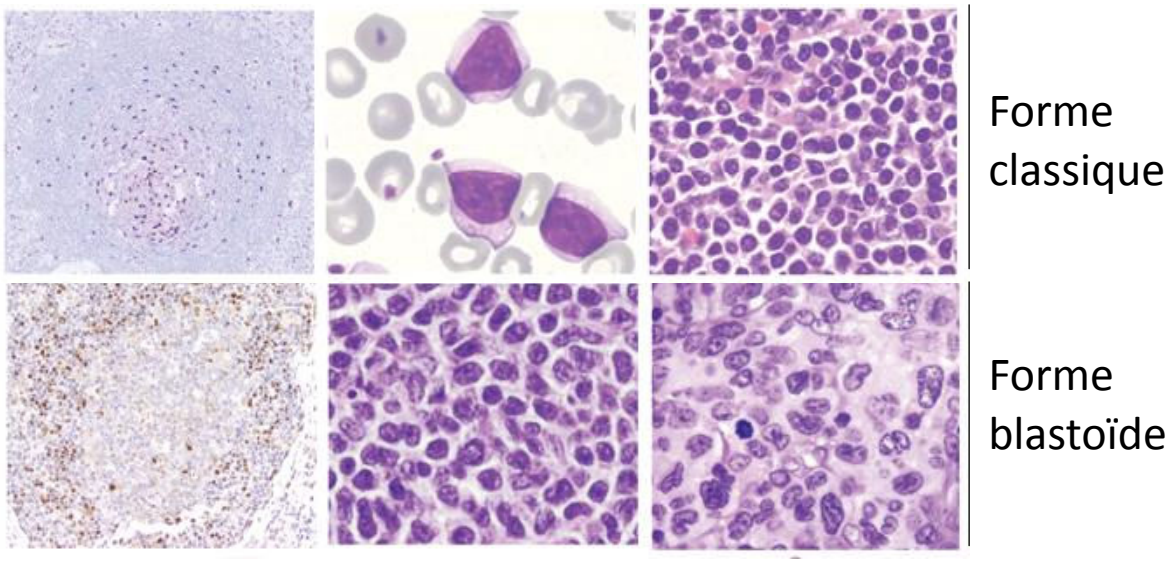


Figure 3 : Hémogramme issues de biopsies ganglionnaires mettant en évidence les lymphocytes B matures pathologiques dans le MCL. Dans la forme classique de MCL, les cellules sont de taille petite ou moyenne (12-20 µm), avec un rapport nucléocytoplasmique proche de 1, le noyau présente un contour irrégulier (encoches, aspect folié) et une chromatine discrètement immature. Dans les formes blastoïdes, la chromatine est encore moins condensée et le noyau est nucléolé. D'après (16).

3. Critères immuno-histochimique et moléculaire

Le diagnostic histologique pouvant être délicat, il est nécessaire de recourir à l'immunophénotypage afin de procéder au diagnostic différentiel avec les autres lymphomes B à petites cellules. Les LCM présentent les marqueurs des lymphocytes B matures naïfs à savoir : CD19, CD20, CD22, CD79-A et les Ig de surface IgM et ou IgD. Ces cellules sont également CD5+, CD10-, CD23-, CD43+ et BCL6-. Cependant certains LCM peuvent présenter des variations phénotypiques notamment pour les formes blastoïdes, ce qui rend le diagnostic difficile (12) (Tableau 1).

Tableau 1. Diagnostic différentiel des principaux LNH en fonction de l'immuno-phénotypage et d'autres marqueurs immuno-histochimiques.

Sous-type histologique	CD20	CD5	CD23	CD43	CD10	BCL-6	Cycline D1
Lymphome du manteau	+	+	-	+	-	-	+
Lymphome folliculaire	+	-/+	-/+	-	+/-	+	-
Leucémie lymphocytaire chronique	+	+	+	+	-	-	-
Lymphome lympho-plasmocytique	+	-	-	-/+	-	-	-
Maltome	+	-	-/+	-/+	-	-	-
Lymphome de la zone marginale	+	-	-	-	-	-	-

+, >90% positif; +/-, > 50% positif; -/+, < 50% positif; -, < 10% positif.

Le LCM en plus d'exprimer cycline D1, possède les marqueurs CD5 et CD43 mais n'exprime pas CD23, CD10 ou BCL-6. D'après (17).

Afin de renforcer le diagnostic, des marqueurs plus récents d'immuno-histochimie (IHC) comme les facteurs de transcription LEF1 (*lymphoid-enhancer-binding 1*) et SOX11 (*sex-determining region Y, box 11*) sont utilisés dans le diagnostic différentiel. Les LCM sont normalement LEF1 négatifs, en effet, ce marqueur est normalement exprimé dans le noyau des LT et dans les lymphocytes pro-B, il est impliqué dans le développement lymphoïde précoce (18). LEF1 est également exprimé de manière aberrante dans presque toutes les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), les lymphomes à petit lymphocytes (SLL) et parfois dans les lymphomes de bas grade (19). SOX11 est important durant l'organogenèse et est très rarement détecté dans les lymphocytes normaux, il est absent dans les LLC et les SLL et présent dans 90 à 95% des LCM, y compris dans les cas cycline D1-négatifs (20). Dans les LLC ou les SLL, les cellules des centres prolifératifs peuvent exprimer cycline D1, cependant, ces cellules ne présentent pas

la t(11;14)(q13;q32), n'expriment pas SOX11 et expriment LEF1. Par conséquent, l'utilisation combinée de SOX11 et de LEF1 est très intéressante pour distinguer les cas de LCM et les cas de LLC/SLL en routine.

4. Etude cytogénétique

La technique de choix pour la détection de la t(11;14)(q13;q32) est l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Il existe cependant quelques cas de LCM où ni la translocation ni la surexpression de cycline D1 ne sont présentes. Dans ces cas de LCM, la cycline D2 ou la cycline D3 sont surexprimées. Le pronostic de ces LCM est en général moins bon que pour les formes classiques (21).

La translocation t(11;14)(q13;q32) est acquise précocement dans la moelle osseuse lors de la recombinaison des segments V(D)J (IGHV) au cours de la différenciation B, dans les cellules pré-B. Elle est nécessaire mais non suffisante à la transformation en LCM, d'autres altérations génétiques secondaires doivent survenir pour entrer dans le processus d'oncogenèse. La cellule précancéreuse va ensuite migrer au niveau du ganglion et c'est au niveau de la zone du manteau des follicules secondaires, après stimulation antigénique que se déroulera la prolifération tumorale.

5. Score pronostique

Il existe un score pronostique spécifique aux patients atteints de LCM : le MIPI (*Mantle cell lymphoma international prognostic index*)(22). Il permet de classifier les patients selon trois groupes de risques distincts : le groupe de faible risque qui comprend 44% des patient avec une survie à 5 ans de plus de 60%, un groupe de risque intermédiaire (35% des patients) avec une survie moyenne de 51 mois et un groupe de haut risque (21%) avec une survie moyenne de 29 mois. Cet index est basé sur quatre facteurs de pronostic indépendants : l'âge, le taux sanguin de lactate déshydrogénase (LDH), le statut de performance de *l'Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (Annexe 1) et le nombre de leucocytes. Le score MIPI est calculé selon la formule suivante.

Score MIPI = [(0,03535 x âge [ans]) x âge [ans] + 0,6978 (si ECOG > 1) + [1,367 x log10 (LDH / limite supérieure de la valeur normale)] + [0,9393 x log10 (leucocytes x 10^9/L)] (22).

Ce score MIPI possède une valeur pronostique uniquement pour la survie mais pas pour la prise en charge thérapeutique et a seulement été validé pour les thérapies de première ligne (Tableau 2). D'après (23).

Tableau 2 : Stratification du risque en fonction du score MIPI

Risque	Score	% patients	Survie médiane
Faible	< 5,7	44	60% à 5 ans
Intermédiaire	Sup ou = 5,7 et < 6,2	35	51 mois
Elevé	Sup ou = 6,2	21	29 mois

L'index de prolifération Ki-67 permet de compléter la valeur pronostique du score, on parle alors de MIPI biologique ou MIPI-B. L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire de 360 kDa qui est exprimée pendant les différentes phases du cycle cellulaire (de G1 à M), avec un niveau maximum durant la phase S. Le calcul de l'index de prolifération s'effectue en immunohistochimie par un dénombrement des cellules marquées dans un champ limité. La valeur seuil qui définit une prolifération importante des cellules tumorales est définie lorsque plus de 30% des cellules tumorales du prélèvement sont marquées positivement. Malheureusement ces scores (MIPI et MIPI-B) ne sont pas assez robustes pour être utilisés prospectivement dans le choix des thérapeutiques initiales. Une meilleure connaissance des facteurs de résistances au traitement devrait permettre une meilleure prise en charge des patients grâce également à l'apport de nouvelles drogues et à l'apparition de nouvelles combinaisons de drogues.

La classification des stades du LMC est celle des LNH, elle est analogue à la classification de Ann Arbor (Tableau 3).

Tableau 3. Classification des LNH selon l'extension et l'évolutivité

Stade I Stade IE	Une seule aire ganglionnaire atteinte Un seul territoire extraganglionnaire atteint
Stade II Stade IIE	Plus de deux aires ganglionnaires atteintes du même côté du diaphragme Associé à une atteinte extraganglionnaire par contiguïté
Stade III Stade IIIE	Atteinte ganglionnaire de par et d'autre du diaphragme Associé à une atteinte extraganglionnaire localisée
Stade IV	Atteinte digestive ou viscérale

III. Mécanismes physiopathologiques connus du LCM

1. Translocation t(11;14)(q13;q32) et surexpression de cycline D1

A l'échelle moléculaire, l'anomalie primaire du LCM est la translocation t(11;14)(q13;q32) qui juxtapose le locus *CCND1* codant pour cycline D1 présent en 11q13, à la région de jonction de la chaine lourde des Ig (*IGH*) du 14q32 (Figure 4). *CCND1* est donc ainsi contrôlé par le promoteur de la chaine lourde des Ig qui est fortement actif dans les LB matures. Il en résulte une expression aberrante de cycline D1 qui est normalement absente des LB normaux. Cycline D1 régule le cycle cellulaire en se liant aux kinases dépendantes des CDK 4 et 6 (*cyclin-dependent kinases* 4/6), le complexe ainsi formé est capable de phosphoryler la protéine suppresseur de tumeur rétinoblastome (RB1). La protéine RB1 ainsi phosphorylée, n'est plus en mesure de séquestrer les facteurs de transcription de la famille E2F, et cela va provoquer la transcription de nombreux gènes, permettant ainsi la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Figure 5).

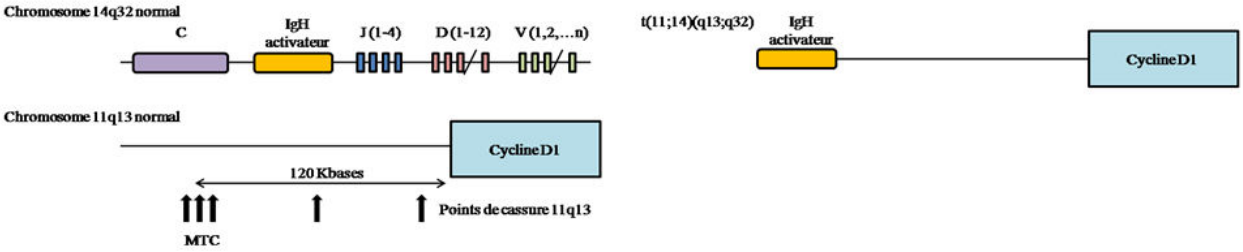


Figure 4 Translocation t(11;14)(q13;q32). Lors du réarrangement VDJ de la chaine lourde des immunoglobuline dans les LB, un *crossing-over* peut survenir entre la région q32 du chromosome 14 portant le gène codant pour la chaine lourde des immunoglobulines et la région q13 du chromosome 11 codant pour *CCND1*. Ce crossing over a lieu le plus fréquemment au niveau de la zone MTC *(major translocation cluster)*. *CCND1* se retrouve donc sous le contrôle du promoteur de IgH qui est fortement régulé dans les LB matures, il en résulte une expression aberrante de cycline D1 qui n'est normalement pas exprimée dans ces cellules. D'après (24).

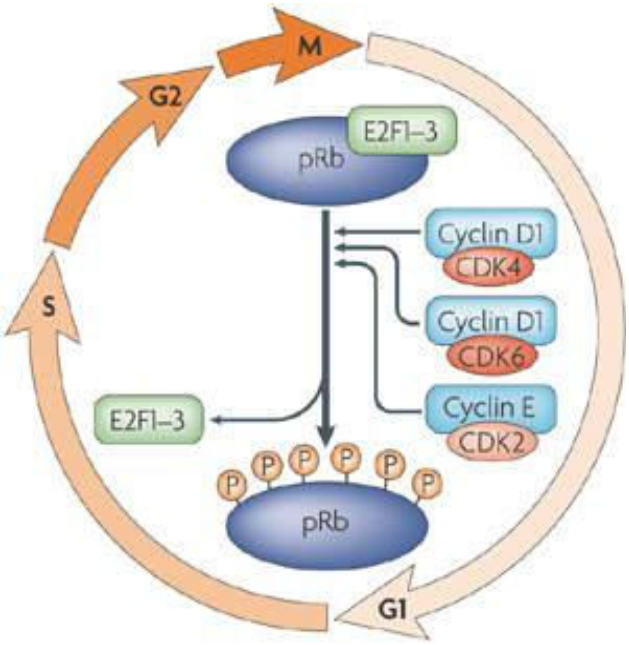


Figure 5 : Transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire sous le contrôle de la cycline D1. Le complexe holoenzymatique cycline D1/CDK4/6 phosphoryle la protéine RB1. Celle-ci, une fois phosphorylée, libère les facteurs de transcription E2F1-3 qui activent la transcription d'un ensemble de gènes nécessaires au passage de la phase G1 à S. D'après (176)

2. Altérations génétiques secondaires

L'instabilité génomique provoquée par l'expression aberrante de cycline D1 a de très nombreuses conséquences dans les cellules pré-tumorales. En effet, celles-ci accumulent aléatoirement et continuellement des mutations qui peuvent activer des oncogènes ou éteindre l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. Cela provoque des dérégulations au niveau de voies de signalisation majeures comme celles de la régulation de l'apoptose.

2.1. Mutations géniques

Les cellules de LCM sont caractérisées par une instabilité génomique importante. Les aberrations récurrentes les plus fréquentes incluent des gains de gènes portant des oncogènes : *SOX11* (2p ; 95%), *MYC* (8q ; 18%) ainsi que des délétions de gènes codant pour des suppresseurs de tumeurs : *RB1* (13q ; 26%), *ataxia telangiectasia mutated* (*ATM*) (11q ; 25%), *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A* ou p16) (9p ; 25%) ou encore *TP53* (17p ; 22%). Ces deux dernières altérations sont des facteurs de mauvais pronostic indépendants de l'index de prolifération mesuré par le Ki67 (25). Des mutations affectent également certains gènes contrôlant la régulation épigénétique comme *WHSC1* (10%), *MLL2* (14%) *MEF2B* (3%) et

NOTCH1/2, elles sont directement associés avec l'agressivité de la tumeur (26). Il existe une corrélation entre le nombre d'aberrations et l'agressivité de la maladie, en allant de la pathologie indolente jusqu'à la forme blastoïde très agressive.

2.1.a. Activation d'oncogènes

SOX11 est un puissant oncogène, son extinction dans un modèle de xénogreffe est associé à une croissance tumorale réduite, en accord avec le profil d'évolution indolente des patients n'exprimant pas SOX11 (27). Il permet la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse *via* l'axe *platelet derived growth factor subunit A* (*PDGFA*). D'autre part, SOX11 permet l'expression de C-X-C chemokine receptor type 4 *(CXCR4)* et de *Focal adhesion kinase* (*FAK)* en se fixant sur des séquences régulatrices de ces gènes. CXCR4 est un récepteur membranaire spécifique de la chimiokine SDF1 (*stromal derived factor 1* ou CXCL12) qui joue un rôle important dans la domiciliation des cellules B dans la moelle osseuse. FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique activée par des récepteurs de facteurs de croissance ou d'intégrines. Elle est essentielle au niveau du microenvironnement tumoral pour faciliter la migration cellulaire, l'invasion, la progression tumorale et les métastases. SOX11 joue par conséquent un rôle important en permettant aux cellules de LCM de franchir la barrière endothéliale et envahir des sites ganglionnaires et extra-ganglionnaires (28).

Dans les LCM, l'expression de c-MYC est fréquemment anormale, pour différentes raisons : augmentation de la stabilité de c-MYC par activation de la voie du B cell receptor (BCR), réarrangement moléculaire en 8q24 de type amplification du locus ou de type translocation activatrice. Les LCM présentant ce dernier type de réarrangement sont rares mais de mauvais pronostic, la plupart du temps associé à la forme blastoïde de la pathologie (29). c-MYC est un facteur de transcription qui régule environ 15% des gènes et qui confère aux cellules un effet prolifératif important. Il est normalement régulé très finement et sa surexpression en fait un puissant oncogène retrouvé dans de nombreuses pathologies (30).

2.1.b. Anomalies de gènes suppresseurs de tumeur

Jares *et al.* (31), ont montré que des délétions intragéniques homozygotes de *RB1* étaient présentes dans quelques cas de LCM et que la perte d'expression de RB1 était associée à

un phénotype agressif de type blastoïde. RB1 séquestrant physiologiquement le facteur de transcription pro-prolifératif E2F1, la perte de son expression entraine une entrée en phase S du cycle cellulaire.

Le gène *ATM* est fréquemment muté dans les LCM, ce gène code pour ATM qui est impliqué de manière critique dans la réponse aux dommages à l'ADN. Une perte d'expression de cette protéine augmente la fréquence des anomalies chromosomiques et l'instabilité génomique. Les mutations retrouvées dans le LCM sont principalement des troncatures ou des mutations faux-sens impliquant le domaine PI3K de la protéine. Les mutations d'*ATM* touchent indifféremment les formes classiques comme les formes blastoïdes, cela pourrait laisser supposer qu'ATM est impliqué dans le développement tumoral précoce (32).

Les altérations du gène *TP53* en position 17p13 sont l'anomalie génétique la plus courante retrouvée dans les cancers humains. Dans les LCM on retrouve des délétions 17p ainsi que des mutations sur les exons 4 à 8 qui codent pour le domaine de liaison à l'ADN. Le gène code pour la protéine p53 qui est un facteur de transcription régulant des fonctions cellulaires comme la mitose et l'apoptose. A l'état basal, dans une cellule normale, p53 est très peu exprimée car elle se lie avec MDM2 (murine double minute 2), une E3 ubiquitine ligase, ce qui provoque sa dégradation. Lorsque la cellule est stressée, suite par exemple à des lésions de l'ADN, des défauts dans le métabolisme ou dans la division cellulaire, la liaison de p53 et de MDM2 est abolie, on parle de phase d'activation. Dans un deuxième temps, la structure de p53 est modifiée pour que la protéine puisse jouer le rôle de facteur de transcription, c'est la phase de modification. Enfin, p53 active la transcription de nombreux gènes. En fonction de la sévérité du stress cellulaire, deux possibilités émergent de cette phase de réponse : un arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages à l'ADN ou bien l'entrée de la cellule en apoptose si les dommages sont trop importants. Un des rôles de p53 est d'activer l'expression du gène *BAX* dont la protéine a pour effet le déclenchement de l'apoptose en perméabilisant la membrane mitochondriale et permettant ainsi la sortie du cytochrome C dans le cytoplasme. La protéine p53 est donc indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire ; la perte de son expression dans les cancers et plus précisément dans les LCM est associée à un mauvais pronostic et à une prédominance de la forme blastoïde (33).

Le gène *CDKN2A* est localisé sur le chromosome 9, il code pour la protéine p16 qui agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant l'activité de kinase de CDK4/6 et par la même la phosphorylation de RB1. Ce gène est retrouvé muté avec une perte d'expression de p16 dans les variants les plus agressifs de LCM et associé à une durée de survie plus courte des patients. Il n'existe pas de corrélation entre le statut mutationnel de *CDKN2A* et de *TP53*, cela semble indiquer que ces deux gènes participent à l'oncogenèse de manière indépendante (34).

2.2. Voies de signalisation dérégulées

2.2.a. Voie PI3K/AKT

L'activation constitutive de la voie phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt survient principalement dans les formes agressives blastoïdes de LCM et est impliqué dans la pathogenèse de la maladie (35). Cette voie de signalisation très complexe fait intervenir PI3K qui est activée par phosphorylation lors qu'elle se lie à un récepteur à tyrosine kinase dimérisé suite à la liaison de son ligand spécifique. Cette PI3K activée va phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP_3). PIP_3 est ensuite capable d'activer la kinase AKT qui est une proto-oncoprotéine qui a de nombreux substrats et effets. AKT est capable d'inhiber l'apoptose en se liant à BAX l'empêchant ainsi de perméabiliser la membrane mitochondriale. AKT est également capable d'induire la prolifération cellulaire par une cascade d'effecteur en activant *in fine* mTOR qui est capable à son tour d'activer S6K pour qu'elle se lie au ribosome et initie la transcription d'ARNm. Par ailleurs AKT est capable de diminuer la concentration des protéines suppresseurs de tumeur de la famille FOXO en les phosphorylant ce qui provoque leur ubiquitinylation puis leur dégradation par le protéasome. L'activation constitutive de cette voie provoque une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la prolifération. Un des mécanismes possible de cette activation constitutive dans le LCM, est la perte d'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) qui est capable de déphosphoryler PIP_3 et ainsi de limiter l'action d'AKT (36).

2.2.b. Voie NFκB/STAT3

La voie NFκB *(Nuclear Factor kappa B*) est rarement activée spontanément dans les LCM suggérant ainsi que cette voie ne joue pas un rôle clé dans la prolifération et dans la

dérégulation du processus apoptotique dans la pathologie (37). La présence de p65 dans le noyau reflétant l'activation de la voie NFκB est rare mais associée à un mauvais pronostic. En effet, l'activation de NFκB par la voie canonique et/ou non canonique déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques, favorisant ainsi la progression de la pathologie. L'ensemble des mécanismes physiopathologiques du LCM sont récapitulés en Figure 6.

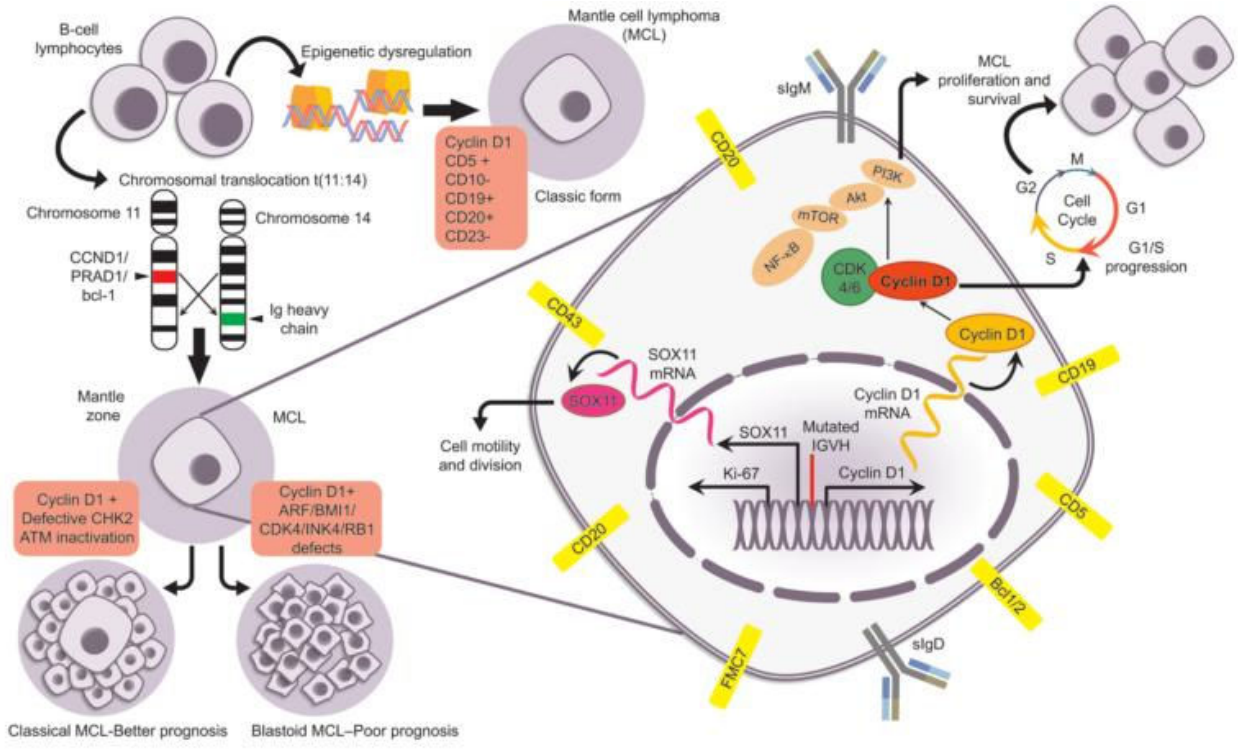


Figure 6 : Schéma récapitulatif des mécanismes physiopathologique du LCM. Les lymphocytes B exprimment anormalement cycline D1 soit à cause de la translocation t(11;14) ou à cause de dérégulation épigénétique. En fonction des altérations génomiques secondaires différentes forme de LCM sont possibles. La surexpression de cycline D1 favorise directement la prolifération par entrée dans le cycle cellulaire, cycline D1 provoque également l'activation des voies NF-κB et AKT favorisant la prolifération et la survie des cellules. L'expression de SOX11 favorise la mobilité cellulaire ainsi que la division. D'après (38).

3. Importance du micro-environnement

Les altérations géniques intrinsèques aux cellules comme la surexpression de cycline D1 et de BCL2 ne sont pas suffisantes pour entrainer la prolifération observée *in situ*, d'une part et d'autre part, pour protéger les cellules malignes d'une apoptose spontanée massive *ex vivo*.

En plus des anomalies intrinsèques à la tumeur, des signaux extrinsèques provenant du microenvironnement tumoral (MET) sont essentiels à l'expansion du LCM. Par exemple, on a pu observer une prolifération différentielle d'un même clone en fonction de sa localisation tissulaire (39).

Comme cela a été décrit dans d'autres hémopathies B telles que la LLC (40) ou le LF (41), ces signaux extrinsèques sont connus pour favoriser la croissance, la survie et la migration. Des interactions cellules tumorales/MET sont possibles à la fois dans le ganglion et en dehors (moelle osseuse, tractus intestinal), permettant les disséminations précoces observées dans la majorité des patients au diagnostic (42). *In situ*, les LB sont en contact étroit avec des cellules du système immunitaire, comprenant les LT et les macrophages exprimant CD40L et des cellules mésenchymateuses comme les cellules stromales ou les cellules folliculaires dendritiques. Des études ont montré que la co-culture de cellules tumorales avec des cellules stromales favorisait la survie cellulaire à travers différents mécanismes comme une diminution de l'expression de Bim ou une résistance aux cytotoxiques par un phénomène appelé CAM-DR (*cell adhesion-mediated drug resistance*) (43).

La co-culture de cellules de patients *ex vivo* en présence de cellules lymphoïdes-*like* (exprimant CD40L) permet la progression des cellules de LCM dans le cycle cellulaire. Ce mécanisme est amplifié en présence de cytokines spécifiques du LCM : insulin-like growth factor-1 (IGF1), B-cell activating factor (BAFF), interleukine (IL)-6 et IL-10 (44).

La physiopathologie du LCM est donc un ensemble de mécanismes très complexes qui sont à prendre en compte dans l'objectif de traiter les patients

IV. Stratégies thérapeutiques

Malgré l'arrivée récente de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses qui ont sérieusement amélioré le pronostic des patients, le LCM reste une pathologie incurable destinée à rechuter. Des études rétrospectives suggèrent que 30% des patients nouvellement diagnostiqués présentent une pathologie indolente qui ne requiert pas de traitement immédiat. Cliniquement, ces patients présentent une faible lymphocytose, une lymphadénopathie peu volumineuse, une légère splénomégalie, ainsi qu'une infiltration modeste dans la moelle et/ou dans le tractus digestif. L'index de prolifération au Ki-67 bas (< 30%) est cohérent avec une pathologie indolente, un suivi attentif, tous les 3 à 6 mois, de ces patients est alors préférable (45,46)

La prise en charge des patients est effectuée après discussion en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) en considérant les caractéristiques individuelles du patient : âge, comorbidités, facteurs de risques et traitements antérieurs.

1. Stratégie en première ligne pour les patients jeunes de moins de 65 ans

Chez le patient jeune, en première ligne, le protocole LyMa sera appliqué. Il consiste en la combinaison de 4 cures de rituximab-dexaméthasone, cytarabine, cisplatine (protocole R-DHAC) espacées de 21 jours (47), un prélèvement des cellules souches périphériques au décours de la troisième cure afin de pouvoir réaliser une intensification du traitement en utilisant de forte dose de carmustine, étoposide, cytarabine, melphalan (protocole BEAM) ou bien une irradiation corporelle totale (ICT) associée à un agent alkylant. La toxicité de cette intensification sera compensée par une autogreffe des cellules souches du patient (CSP). Une maintenance par rituximab tous les 2 mois pendant 3 ans est ensuite réalisée.

1.1. Conditionnement

La première étape du traitement, le conditionnement, est constituée de 4 cures de chimiothérapies espacées de 28 jours chacune. Dans le protocole R-DHAC, 4 anticancéreux sont associés : le rituximab (Mabthera®), la dexaméthasone (Neodex®), la cytarabine (Aracytine®) et le

cisplatine. Cette phase d'induction permet l'obtention d'un taux de réponse complète morphologique de 60 à 90% (48).

1.1.a. Le rituximab

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 que l'on retrouve sur les lymphocytes pré-B et B matures, ainsi que dans 95% des cellules B des lymphomes non-hodgkiniens. La fixation de cet anticorps sur sa cible entraine la lyse des lymphocytes par plusieurs mécanismes : lyse par le complément, action des cellules cytotoxiques possédant des récepteurs au fragment Fc et par induction de signaux pro-apoptotiques. Il est injecté i.v. à J1 de la cure à la dose de 375 mg/m^2 de surface corporelle puis chaque semaine pendant 1 mois. Une prémédication par un antipyrétique et un antihistaminique doit toujours être donnée, afin que le syndrome de relargage cytokinique soit évité (49).

1.1.b. La dexaméthasone

La dexaméthasone est un anti-inflammatoire stéroïdien à demi-vie biologique longue et est utilisé pour son effet glucocorticoïde prolongé. Il est administré de J1 à J4 par voie orale à une dose de 40 mg. A l'instar des autres glucocorticoïdes, son mécanisme d'action est plurivalent. Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes sont activés par liaison de la dexaméthasone permettant ainsi la translocation du complexe récepteur/ligand au niveau nucléaire. La synthèse de certaines protéines est ainsi activée ou bien inhibée par la liaison du complexe au niveau de sites régulateurs spécifiques.

Les protéines dont la synthèse est initiée sont, entre autres, la lipocortine-1, qui inhibe la phospholipase A2 essentielle pour la réaction inflammatoire et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) impliquée dans le circuit de régulation de la pression artérielle.

Les protéines dont la synthèse est inhibée, sont des cytokines (*tumor necrosis factor-α* (TNF-α), IL-2, IL-6), qui activent les cellules du système immunitaire et diverses enzymes pro-inflammatoires (collagénase). L'induction de la NO-synthétase et de la cyclo-oxygénase est également inhibée (49).

1.1.c. La cytarabine

La cytarabine est un anti-métabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire, elle est métabolisée en sa molécule active l'ARA-CTP qui est un analogue de la pyrimidine. La synthèse de l'ADN est bloquée lorsque ce métabolite y est incorporé. Le métabolisme cellulaire est perturbé par des anomalies structurales secondaires à son incorporation. La cytotoxicité passerait aussi par une inhibition de l'ADN polymérase et par une action sur le système des kinases.

Elle est administrée en perfusion intraveineuse (i.v.) à J2 en 2 prises espacées de 12 h, à la dose de 2 g/m^2 de surface corporelle chaque. La cytarabine présente principalement une toxicité hématologique, hépatique et rénale (49).

1.1.d. Le cisplatine

La synthèse de l'ADN est inhibée par la formation de ponts inter- et intra-caténaires suite à la liaison de l'ADN au cisplatine qui agit comme un agent alkylant. La synthèse de l'ARN et des protéines est inhibée secondairement.

Il est utilisé en monoprise par perfusion i.v. à J1, à la dose de 100 mg/m^2 de surface corporelle (49).

1.2. Intensification

L'intensification est envisagée dans les formes agressives de lymphome, elle a pour but de lever la résistance des cellules tumorales en augmentant les doses de cytotoxiques. Cette augmentation de dose se heurte à la toxicité des drogues sur les cellules saines de l'organisme et particulièrement pour les cellules hématopoïétiques. Afin de résoudre ce problème une autogreffe à partir des cellules souches circulantes peut être réalisée.

Au décours de la troisième cure, le prélèvement de CSP est effectué (3.10^6 cellules/kg de poids du patient sont recueillies). Afin d'atteindre ce nombre de cellules, de 3 à 4 cytaphérèses sont réalisées après stimulation des cellules souches hématopoïétiques par des facteurs de croissance hématopoïétiques : G-CSF (Neupogen®) ou GM-CSF (Granocyte®). Le nombre de CSP est ainsi augmenté par le traitement. Si malgré cela, le nombre de CSP circulant est insuffisant,

le prélèvement de cellules souches hématopoïétiques sera réalisé par plusieurs biopsies ostéomédullaires sous anesthésie générale. Les cellules sont congelées dans de l'azote liquide et peuvent être conservées ainsi pendant 10 ans. Un traitement *ex vivo* peut être réalisé afin de minimiser le risque de réinjecter des cellules tumorales. Le bénéfice de la consolidation se retrouve en termes de survie sans progression (SSP) et de survie globale (SG) (90 *vs*. 54 mois) (50).

L'intensification thérapeutique est réalisée en administrant de fortes doses de 4 anticancéreux : protocole BEAM : carmustine (Bicnu®), etoposide (Celltop®), cytarabine (Aracytine®), melphalan (Alkeran®)

1.2.a. La carmustine

La carmustine est un antinéoplasique cytostatique alkylant appartenant à la famille des nitrosourées. L'activité anticancéreuse est obtenue par alkylation de l'ADN et de l'ARN ainsi que par la carbamylation des protéines (fixation non enzymatique d'acide isocyanique, métabolite de l'urée). Le passage de la barrière hémato-encéphalique est permis par une grande lipophilie et une non ionisation au pH physiologique, cette molécule revêt donc un intérêt supplémentaire dans la prise en charge des patients atteints de métastases cérébrales.

Elle est administrée par perfusion lente i.v. 6 jours avant l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (J-6), à la dose de 300 mg/m^2 (49).

1.2.b. L'étoposide

L'étoposide est un agent intercalant semi-synthétique dérivé de la podophyllotoxine, aux propriétés plus lipophiles que cette dernière. L'activité cytotoxique est obtenue par inhibition de la topoisomérase II chargée de ressouder les brins d'ADN après leur cassure lors de la phase S. L'entrée en mitose est ainsi bloquée ; à de plus fortes concentrations, une lyse des cellules en mitose est également observée.

L'étoposide est administré par perfusion i.v. deux fois par jour de J-5 à J-3 à la concentration de 200 mg/m^2 (49).

1.2.c. La cytarabine

Elle est utilisée à la dose de 100 mg/m^2 deux fois par jours de J-5 à J-2.

1.2.d. Le melphalan

Le melphalan est un agent alkylant du groupe des moutardes azotées. L'activité cytostatique est obtenue par la formation de liaisons covalentes stables entre les groupements nucléophiles des brins d'ADN, empêchant ainsi la réplication cellulaire.

Il est utilisé à la dose de 140 mg/m^2 à J -1 par voie i.v. en perfusion lente (49).

1.3. Maintenance

En dépit de ces avancées en terme de réponse complète (RC) ou de négativation de la MR, les patients demeurent exposés à la rechute au cours du temps. L'essai LyMa (www.nationalclinicaltrials. gov, #NCT00921414) a montré qu'une maintenance par du rituximab tous les 2 mois pendant 3 ans améliorait le taux de survie sans évènement à 3 ans de 93 à 82%. Une stratégie de maintenance par un agent immunomodulateur : le lénalidomide est en cours d'évaluation dans l'étude FIL-MCL0208 (www.nationalclinicaltrials. gov, #NCT02354313) (51).

2. Alternatives chez le patient jeune en cas de non réponse au traitement R-DHAC.

A la rechute, la stratégie repose essentiellement sur l'utilisation de drogues non reçues en première ligne, la durée de réponse initiale et l'âge à la rechute. En cas de non-réponse sous le protocole R-DHAC, une intensification du traitement est envisagée, vers un protocole R-CHOP pour 4 cures espacées entre elles de 14 jours (contre 21 jours habituellement si le patient répond correctement). Dans ce protocole, 5 anticancéreux sont associés : le rituximab (Mabthera®), le cyclophosphamide (Endoxan®), la doxorubicine *(doxorubicin hydrochloride)* (Adriblastine®), la vincristine (Onconvin®) et la prednisone (Cortancyl®). D'autre part, l'utilisation de la bendamustine en combinaison avec le rituximab et l'aracytine (protocole R-BAC) a montré des résultats intéressant avec une RG de 80% et une survie sans progression (SSP) de 70% à 2ans, malgré une toxicité hématologique importante mais surmontable. D'autres drogues non cytotoxiques comme les inhibiteurs du protéasome : bortezomib, carfilzomib ou encore les immunomodulateurs : lénalidomide, ont montré des RC faibles en monothérapie, mais des associations avec le rituximab permettent d'améliorer ces taux de réponses. L'arrivée d'un

inhibiteur de la tyrosine kinase Bruton (BTK) : l'ibrutinib a marqué un tournant dans la prise en charge du LCM en rechute ou réfractaire avec des taux de rémissions jamais rencontré en monothérapie (67% de RC) (52). Dans les stratégies de consolidation de la réponse en rechute, l'allogreffe est une stratégie qui peut se discuter.

2.1. Protocole R-CHOP :

2.1.a. Le rituximab

Il est utilisé à la dose de 375 mg/m^2 à J1 de la cure.

2.1.b. Le cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est un agent alkylant bifonctionnel de type oxazaphosphorine appartenant à la famille des moutardes azotées. L'activité cytostatique est obtenue suite à une interaction directe avec l'ADN et la formation de liaisons covalentes sur les sites nucléophiles, par l'intermédiaire de radicaux alcoyles. Cette liaison inhibe ainsi l'activité de transcription et de réplication (49).

Il est utilisé à la dose de 750 mg/m^2 en perfusion i.v. à J1 ou à J3.

2.1.c. La doxorubicine :

La doxorubicine est un agent cytotoxique intercalant de la famille des anthracyclines. L'effet cytotoxique est obtenu par plusieurs mécanismes d'action : l'intercalation avec les polymérases de l'ADN et de l'ARN, l'inhibition de la topo-isomérase II, la formation de radicaux libres et la fixation sur les membranes (49).

Elle est utilisée à la dose de 50 mg/m2 en IV à J 1 ou J 3.

2.1.d. La vincristine :

La vincristine est un alcaloïde de type poison du fuseau, issu de plantes de la famille des pervenches (famille des Apocynacées, genre *Vinca*). L'activité anticancéreuse est obtenue par blocage de la formation des microtubules suite à la liaison de la vincristine au monomère de tubuline et également suite à l'induction d'une dépolymérisation des microtubules existants. Les cellules sont ainsi bloquées pendant la métaphase (49).

Elle est utilisée à la dose de 1.4 mg/m2 en perfusion i.v. à J1 ou à J3.

2.1.e. La prednisone :

La prednisone est un stéroïde à activité glucocorticoïde, son mécanisme d'action est similaire à celui de la dexaméthasone.

Elle est utilisée à la dose de 40 mg/m^2 en voie orale de J1 à J5 ou de J3 à J8. Cela correspond à une dose de 6 mg/m^2 d'équivalent dexaméthasone, avec cependant une demi-vie légèrement plus courte (49).

2.2. Protocole R-BAC

2.2.a. Le rituximab

Il est utilisé à la dose de 375 mg/m^2 à J1 de la cure.

2.2.b. La bendamustine

Le chlorhydrate de bendamustine (Levact®) est un agent alkylant antitumoral dont l'action cytotoxique est obtenue par l'établissement de liaisons covalentes croisées par alkylation de l'ADN simple brin ou double brin. Ces modifications provoquent des anomalies au niveau de la synthèse et de la réparation de l'ADN. La bendamustine présente peu de résistances croisées avec les anthracyclines, les agents alkylants ou le rituximab. Elle a également l'avantage de pouvoir être utilisée chez les patients vulnérables aux cardiopathies en alternatives du R-CHOP. Elle est utilisée à la dose 90 mg/m^2 J1 + J2 (49).

2.2.c. La cytarabine :

Elle est utilisée à la dose de 100 mg/m^2 deux fois par jours de J-5 à J-2.

2.3. Inhibiteurs du protéasome

2.3.a. Le bortezomib

Le bortezomib (Velcade®) est un inhibiteur réversible spécifique de l'activité chymotrypsine-*like* du protéasome 26S dont le rôle est la dégradation des protéines ubiquitinylées. Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire. Les cellules cancéreuses sont plus sensibles que les cellules saines au bortezomib. En effet, l'inhibition de cette voie empêche la protéolyse ciblée et provoque l'accumulation de

signaux de mort cellulaire menant ainsi les cellules à l'apoptose. Le bortezomib agit également en altérant des protéines régulatrices, qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire ainsi que NF-kB, facteur de transcription intervenant dans la croissance, la survie cellulaire, l'angiogenèse et l'interaction avec le microenvironnement (49).

2.3.b. Le carfilzomib

Le carfilzomib (Kyprolis®) est un inhibiteur irréversible du protéasome, il dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement du myélome multiple réfractaire avec un service médical rendu (SMR) important en association au lénalidomide et à la dexaméthasone. L'amélioration du SMR (ASMR) de cette association est cependant mineure (catégorie IV) compte tenu de l'efficacité et de la toxicité de ces molécules en comparaison au rapport bénéfice/risque des molécules déjà présentes dans l'arsenal thérapeutique.

2.4. Immunomodulateur : le lénalidomide

Le lénalidomide (Revlimid®) est un immunomodulateur qui permet de renforcer l'immunité impliquant les LT et les cellules NK. Il inhibe également l'angiogenèse en bloquant la migration et l'adhérence des cellules endothéliales et la formation des micro-vaisseaux. Par ailleurs, le lénalidomide se lie directement à la protéine céréblon, une ubiquitine ligase E3. En présence de lénalidomide, céréblon lie les protéines substrats Aiolos et Ikaros, qui sont des facteurs de transcription de la lignée lymphoïde, ce qui entraîne leur ubiquitinylation puis leur dégradation, avec pour résultat des effets cytotoxiques et immunomodulateurs.

Il est administré par voie orale à la dose de 25 mg/jour pendant 21 jours en espaçant les cures de 7 jours (49).

2.5. Inhibiteurs de tyrosine kinase

2.5.a. Le temsirolimus

Le temsirolimus (Torisel®) est un inhibiteur sélectif de la protéine mTOR. Il agit en se liant à une protéine intracellulaire (FKBP12), puis ce complexe protéine/temsirolimus se lie à son tour à la protéine mTOR et en inhibe l'activité, qui consiste à réguler la division cellulaire. Une fois l'activité de la protéine mTOR inhibée, sa capacité de phosphorylation, et par

conséquent son aptitude à contrôler l'activité des protéines 4E-BP1 et S6K. Ces médiateurs de la signalisation, sont tous deux en aval de mTOR dans la voie PI3 kinase/AKT et bloquent la division cellulaire.

Il est utilisé à la dose de 50 à 175 mg/prise par voie *i.v.*, selon un schéma posologique de 1 fois par semaine pendant 3 semaines (49).

2.5.b. L'ibrutinib

L'Ibrutinib (Imbruvica®) est un inhibiteur irréversible de BTK. BTK, membre de la famille des kinases TEC, est une molécule importante de la voie de signalisation du BCR et des récepteurs aux cytokines. L'ibrutinib agit en formant une liaison covalente avec un résidu cystéine (Cys-481) au niveau du site actif de BTK, inhibant ainsi la cascade des kinases de la voie du BCR (Figure 7).

Au niveau physiopathologique, l'activation de cette voie est importante dans le LCM, car elle permet la prolifération et la survie des cellules. Le rôle essentiel de BTK dans la signalisation *via* BCR résulte en une activation des voies nécessaires à la circulation, au chimiotactisme et à l'adhérence des cellules B. L'ibrutinib est utilisé par voie orale à la dose de 560 mg/jour jusqu'à progression de la maladie ou apparition d'une toxicité inacceptable (49).

Le coût du traitement est actuellement de 8 000 € par mois dans l'indication du LCM, ce point doit être pris en compte dans la réflexion sur un passage éventuel à une indication en première ligne.

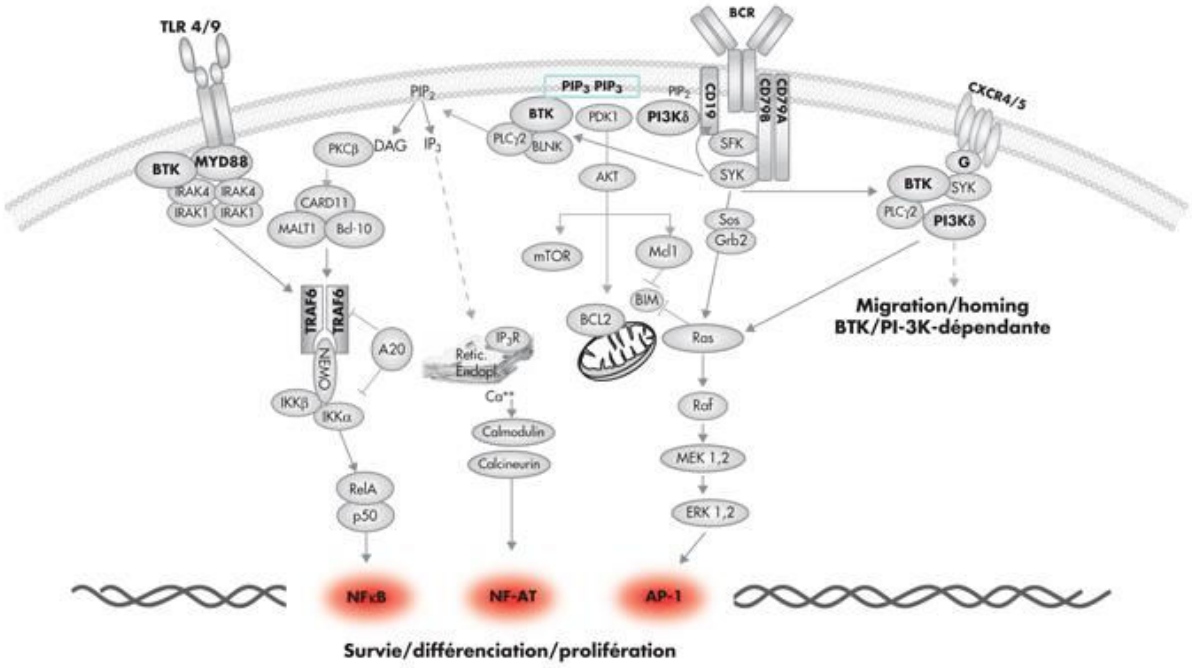


Figure 7 : Voie de signalisation du BCR. BTK peut se déplacer vers la membrane plasmique où il interagit avec PIP3 et se retrouve lié à la membrane plasmique. A ce niveau, lors de la stimulation antigénique du BCR, BTK subit une activation séquentielle par trans-phosphorylation par les kinases LYN et SYK, puis par autophosphorylation. Les substrats en aval du BTK activé font partie des voies NFκB et MEK/ERK. L'activation de BTK *via* BCR provoque des signaux de survie, de différenciation et de prolifération. D'après (53).

3. Stratégie thérapeutique de première ligne pour les patients de plus de 65 ans

Chez le sujet âgé présentant un forme indolente, la prise en charge recommandée est l'abstention thérapeutique associé à une surveillance de la pathologie. En effet la toxicité induite par un traitement serait plus néfaste que bénéfique pour le patient.

Le sujet âgé qui ne présente pas une forme indolente, ne peut pas bénéficier des schémas intensifs que l'on propose au sujet jeune en raison de leurs trop grandes toxicités. La maladie reste incurable et plusieurs lignes thérapeutiques sont nécessaires pour obtenir la médiane de survie à 5 ans.

Le traitement de première ligne de référence en France est de 8 cures de R-CHOP, ce schéma permet un taux de réponse globale de 90% mais une profondeur de réponse relativement faible avec une RC clinique de 35% et un taux de négativation de la maladie résiduelle détectable (MRD) moléculaire de 48%, ainsi qu'une PFS de 18 à 21 mois sans traitement d'entretien (54). Ce traitement initial est poursuivi pour les patients répondeurs par un traitement d'entretien au rituximab à la dose de 375 mg/m^2 tous les 2 mois. Cet entretient permet une augmentation importante de la durée de rémission complète 23 mois *vs*. non atteinte dans le bras rituximab (54). Il existe des alternatives mais qui ne sont pas privilégiées, ainsi le schéma de 4 cures de RVDA+C (rituximab, vincristine, doxorubicine, dexaméthasone + chlorambucil) malgré une toxicité moins importante n'est que peu utilisé du fait de son administration compliquée, en continu sur 4 jours (55). Par ailleurs, le schéma RFC (rituximab, fludarabine, cyclophosphamide) est généralement écarté à cause de sa toxicité plus importante (54). Les patients répondeurs au RCHOP21, un traitement d'entretien par du rituximab à la dose de 375 mg/m^2 tous les 2 mois est proposé, permettant ainsi d'améliorer la durée de rémission des patients (54).

4. Alternatives chez le patient âgé réfractaire de plus de 65 ans.

Bien que de nombreuses opportunités thérapeutiques se présentent depuis ces dernières années, la médiane de survie des patients après leur première rechute est de 1 à 2 ans (56). Actuellement trois monothérapies possèdent l'AMM en rechute : le temsirolimus, l'ibrutinib et le lénalidomide.

4.1. Le temsirolimus

Le temsirolimus a été comparé dans un essai de phase III à d'autres monothérapies plus anciennes (gemcitabine, fludarabine et chlorambucil). Il a montré une amélioration significative mais toujours modeste de la SSP de 4,5 mois contre 1,9 mois, permettant un taux de réponse globale et de RC de 22% et 2 % respectivement. Les doses utilisées en monothérapie sont de 175mg/m^2/semaine pendant 3 semaines puis 75 mg/m^2. Il est également possible d'associer de plus faibles doses (25 mg/semaine) avec du rituximab (375 mg/m^2), afin de diminuer l'asthénie et la toxicité, hématologique notamment (57).

4.2. Le lénalidomide

Le lénalidomide a montré des résultats intéressants aux doses de 25 mg/jour *per os* pendant des cures de 21 jours, avec des améliorations de la PFS de 5.2 à 8.7 mois (58).

4.3. L'ibrutinib

Une posologie de 560 mg/j en continu permet un taux de réponse globale de 68%, avec 21% de RC et une PFS entre 14 et 18 mois. Ces taux de réponse n'ont jamais été égalés en monothérapie chez les patients réfractaires (52).

5. Stratégies thérapeutique en cours de développement

De nombreuses nouvelles drogues (bortezomib, lénalidomide, temsirolimus, rituximab et ibrutinib) ont relativement récemment fait la preuve de leur efficacité dans le LMC et sont ainsi apparus dans l'arsenal thérapeutique. Les profils de tolérances de ces médicaments permettent d'envisager des combinaisons avec les traitements actuels ou entre ces molécules. Les essais cliniques de phases III se concentrent donc sur l'évaluation des combinaisons.

On notera particulièrement dans les essais de phase III les essais « RHAD » et « MCL R2 ederly » organisés par le Lysa *(Lymphoma study association*).

5.1. Essai « RHAD »

L'objectif principal de cet essai est d'évaluer la tolérance d'une association rituximab, aracytine forte dose et dexaméthasone seule ou en association avec le bortezomib pour les LMC en rechute ou réfractaires. C'est un essai prospectif multicentrique espérant recruter 200 patients (59).

5.2. Essai « MCL R2 ederly »

L'objectif principal de cet essai est d'évaluer si l'ajout de lénalidomide à un traitement de maintenance par rituximab, améliore la PFS par rapport au rituximab seul chez des patients âgés répondeurs à un traitement d'induction mais non éligibles à un traitement d'intensification accompagné d'une autogreffe de CSP. C'est une étude multicentrique prospective espérant recruter 630 patients (59).

6. Nouvelles molécules

En plus des nouvelles combinaisons de traitement évaluées dans les essais cliniques de phase III, de nouvelles molécules semblent prometteuses et attendent l'obtention de l'AMM dans le LCM. Parmi ces molécules on retrouve l'obinutuzumab, le vénétoclax et l'idéalisib.

6.1. L'obinutuzumab

L'obinutuzumab (Gazyvaro®) est un anticorps monoclonal anti-CD20 recombinant humanisé. Il est dirigé contre la boucle extracellulaire de l'antigène CD20 présent sur les lymphocytes pré-B et B matures, malins et non malins. Il a été modifié pour que son fragment Fc ait une meilleure affinité avec le récepteur FcRIII des NK et des monocytes/macrophages. Ce médicament possède une AMM dans la LLC et dans le lymphome folliculaire. Il pourrait obtenir l'AMM en remplacement du rituximab

6.2. Le vénétoclax

Le vénétoclax (Venclyxto®) possède une AMM dans le traitement chez l'adulte de la LLC en rechute en monothérapie et ce indépendamment du statut mutationnel de TP53 ou de la présence d'une délétion 17p. C'est un puissant inhibiteur sélectif de la protéine anti-apoptotique BCL-2 qui est un constituant de la voie du BCR, en aval de BTK (Figure 8)(49). Des études récentes ont montré que l'utilisation du vénétoclax pourrait être intéressante en monothérapie dans les LCM en rechute (44). Des essais cliniques sont actuellement en cours pour déterminer l'efficacité chez les patients (www.nationalclinicaltrials. gov, #NCT02558816).

6.3. L'idélalisib

L'idélalisib (Zydelig®) possède une AMM dans le traitement de seconde intention de la LLC et en troisième intention dans le LF. Il agit en inhibant la PI3K p110δ (PI3Kδ) qui est hyperactive dans les hémopathies malignes B et qui joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie, la migration et la rétention des cellules tumorales dans les tissus lymphoïdes primaires et secondaires (Figure 8) (49). Des résultats ont démontré que l'idélalisib possédait des effets modérés sur les cellules de LCM, et il pourrait éventuellement obtenir l'AMM dans cette indication (60).

7. Suivi de la maladie résiduelle

Le suivi de la maladie résiduelle (MR) est un enjeu majeur car il permet une évaluation du pronostic, une stratification des thérapeutiques et une appréciation des traitements préventifs. Un suivi optimal de la MR est nécessaire durant la rémission car il permet un ajustement thérapeutique précoce, au moment de la rechute, lorsque la maladie redevient détectable. Ce suivi doit être possible de manière rapide, économique, avec la meilleure sensibilité et spécificité possible. Actuellement, l'outil de référence de suivi de la MR est la PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR) où sont recherchés une amplification clonale d'IgH ou bien un réarrangement d'IgH-BCL1 qui sont informatifs dans 90% et 40% des patients respectivement (61). De récents progrès technologiques permettent d'entrevoir d'autres techniques plus performantes, ainsi la cytométrie en flux (CMF) 8 couleurs présente désormais une meilleure sensibilité que la RQ-PCR. Cette technique se base sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorophores : CD3/CD14/CD56-FITC (isothiocyanate de fluorescéine), LAIR-1/CD305-PE (phycoérythrine), CD19-PeCy7 (conjugué PE cyanine 7), CD5-PerCPCy5.5 (conjugué peridinin chlorophyll protein cynanin 5.5), CD11A-APC (allophycocyanine), λ-(Alexa 700), κ-(Pacific Blue) et CD45-(V500) sur un petit nombre (2.10^5) de cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMC) isolées par gradient de Ficoll (62). Les caractéristiques de ces fluorophores sont décrits dans l'annexe 2.

B. Les modèles d'étude du lymphome à cellules du manteau

Afin de comprendre la physiologie d'une pathologie, afin de rechercher et d'évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques et afin d'estimer les paramètres de pharmacodynamie et de toxicité de nouvelles molécules, il est absolument nécessaire d'utiliser des modèles d'étude capables de mimer la pathologie. Ces modèles sont par essence imparfaits mais ils sont des prérequis essentiels afin de valider les méthodologies d'un point de vue préclinique, avant, éventuellement de passer chez le patient à des études cliniques. Nous allons décrire les principaux modèles d'études *in vitro* et *in vivo* du LCM.

I. Les modèles d'études *in vitro*

On ne peut pas dissocier la recherche préclinique sur le cancer de l'utilisation de lignées cellulaires. Chaque lignée cellulaire est issue d'un patient avec sa propre histoire, pathologie débutante ou en rechute, vierge de tout traitement ou bien ayant développé des résistances à de nombreuses molécules. Les lignées cellulaires sont des outils indispensables pour toutes les techniques de biologie moléculaire puisqu'elles permettent l'isolement des composants de la cellule (protéines, ADN, ARN…), et pour les techniques de biologie cellulaires (analyse du comportement de la cellule dans son ensemble). Ces deux types de méthodologie sont complémentaires pour comprendre la physiopathologie.

1. Les lignées cellulaires de LCM

Une lignée cellulaire est une population clonale de cellules stables, établie à partir de cellules primaires de patients atteints d'un LCM. Ces cellules sont donc capables d'être maintenues dans des flacons de culture d'où la dénomination *in vitro*.

1.1. Granta519

La lignée Granta519 a été établie à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'une femme caucasienne de 58 ans présentant un LCM leucémisé en rechute de stade IV. Cette

patiente avait un historique de carcinome cervical. La lignée cellulaire est infectée par le virus Epstein-Barr (EBV). Le caryotype est hypodiploïde mais avec 8% de polydiploïde, et présente l'activation de *CCND1* ainsi qu'une délétion de p15/p16 (63).

1.2. JeKo1

La lignée JeKo-1 a été établie à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'une femme de 78 ans présentant un LCM en conversion leucémique. Le caryotype est très hautement réarrangé, hypertriploïde et présente la t(11;14)(q13;q32) (63).

1.3. JVM2

La lignée JVM2 a été établie à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'une femme caucasienne de 63 ans atteinte au moment du diagnostic d'un LCM ayant évolué vers une leucémie B prolymphocytique et portant la t(11;14)(q13;q32). La lignée cellulaire est positive pour l'EBV.

1.4. Mino

La lignée Mino a été établie à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'une femme caucasienne de 68 ans présentant un LCM en rechute. Le caryotype est complexe et hypertriploïde avec la présence d'une double translocation IGH/CCND1 t(11;14)(q13;q32) et IGH/MYC t(8;14)(q24;q32) (63).

1.5. NCEB1

La lignée NCEB1 a été établie par la transformation par l'EBV à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'un patient de 57 ans présentant un LCM. Les analyses cytogénétiques ont mis en évidence la présence de deux clones avec des variations : le premier clone est hypodiploïde avec un caryotype complexe et la translocation t(11;14)(q13;q32) et l'autre clone est presque tétraploïde avec les même marqueurs. De manière surprenante, il a été mis en évidence en 2006 que la lignée NCEB1 présentait de manière stable des chromosomes murins et exprimait la protéine BCL-2 à la fois humaine et murine (63). Elle est donc rarement utilisée.

1.6. REC1

La lignée REC1 a été établie à partir des cellules tumorales prélevées d'un ganglion lymphatique d'un homme de 61 ans en phase terminale réfractaire d'un LCM de variant blastoïde. Cytogénétiquement, la lignée est hautement réarrangée avec un caryotype presque tétraploïde, une surexpression de cycline D1 et la protéine p53 non fonctionnelle (63).

1.7. Z138

La lignée Z138 a été obtenue à partir de cellules circulantes du sang périphérique d'un homme caucasien de 70 ans présentant un LCM de variant blastoïde en phase terminale de la maladie. Le caryotype est hyperdiploïde et présente en plus de la t(11;14)(q13;q32) d'autres anomalies comme : del(5)(p15), der(9)t(9;?), der(14)t(8;14)?, et add(17p) (63).

Le statut mutationnel des gènes TP53, ATM et CDKN2A des différentes lignées est récapitulé dans le Tableau 4.

Tableau 4. Statut mutationnel de gènes importants pour la physiopathologie des lignées de LCM les plus communes

MCL cell line	*TP53*	*ATM*	*CDKN2A*
Granta519	del/wt	del/mut	hom del
JeKo1	del/mut	ampl/nd	del/nd
JVM2	wt/wt	nd/nd	nd/nd
Mino	upd/mut	wt/nd	upd/nd
NCEB1	del/mut	del/nd	wt/nd
REC1	mut/wt	wt/nd	hom del
Z138	wt/wt	del/nd	hom del

Les gènes *TP53*, *ATM* et *CDKN2A* sont touchés par des délétions (del) qui peuvent être homozygote (hom), ou des mutations (mut). Le génotype peut également rester sauvage (wild type = wt) ou non déterminé (nd). D'après (63)

2. Culture de cellules primaires de patients, méthodes *ex vivo*

Les cellules primaires proviennent directement du tissu prélevé chirurgicalement (biopsie ganglionnaire) ou d'une prise de sang chez le patient. L'échantillon comprend plusieurs types cellulaires différents et les cellules ne peuvent être maintenues en culture que pendant quelques jours. L'utilisation de ces cellules, bien qu'elle présente des contraintes permet de se placer au plus proche de la réalité de la vie de la cellule. Les techniques de biologie cellulaires utilisées sur ce type de cellules sont appelées des méthodes *ex vivo* (64).

L'utilisation des lignées cellulaires ou des cellules primaires permet la mise en place de modèles *in vivo* détaillés ci après.

II. Les modèles d'étude *in vivo*

1. Xénogreffes sous-cutanées

Des modèles murins de xénogreffe sous-cutanée ont été mis en place pour pouvoir évaluer l'effet des thérapeutiques anticancéreuses sur la croissance tumorale. Des souris immunodéficientes sont utilisées : souris *nude* ne possédant pas de thymus fonctionnel ; souris SCID (*severe combined immunodefficiency*), ayant un défaut du gène de la recombinase *RAG2* et ne possédant ni LT ni LB ; ou encore souris NSG (*non obese diabetic SCID IL2Rgamma null*) ne possédant ni LT, ni LB, ni macrophages, ni cellules NK, ni cellules dendritiques, ni complément. L'immunodéficience des ces souches murines permet de tolérer la présence d'une xénogreffe.

Les cellules tumorales sont injectées par voie sous cutanée (s.c.) dans une solution de Matrigel® permettant de maintenir la tumeur au niveau du site d'injection. La croissance de la tumeur peut être évaluée au cours du temps en mesurant la largeur et la longueur de la masse tumorale. Ces mesures permettent de déterminer un volume tumoral selon la formule : Volume tumoral (mm^3) = ½ largeur x $(longueur)^2$ mesuré en mm.

La détermination du volume tumoral peut être plus précise grâce à des techniques d'imagerie par *positron emission tomography* (PET) en utilisant le traceur isotopique ^{18}F-3'-Fluoro-3'-deoxythymidine (^{18}F-FLT) (65). Le suivi par PET peut également être réalisé en

incorporant du ^{18}F fluoro-D-glucose qui est absorbé abondamment par les cellules cancéreuses qui sont grande consommatrice de glucose (66).

2. Xénogreffes après injections i.p.

Afin de pouvoir modéliser les interactions cellules tumorales/microenvironnement, d'autres méthodes ont été utilisées. Les cellules tumorales provenant de lignées cellulaires en culture sont injectées dans la circulation générale. Celles-ci vont être en mesure de se domicilier au niveau des niches tumorales propices à leur croissance, en permettant la mise en place des interactions des cellules tumorales avec un microenvironnement *ad hoc*. En effet, après euthanasie des animaux, les cellules tumorales ont été retrouvées au niveau du sang périphérique, de la moelle osseuse, de la rate et dans d'autres tissus comme le foie. La dissociation des organes, la réalisation de suspensions cellulaires, leur marquage par des anticorps spécifiques et leur analyse en CMF permet de vérifier la nature des cellules tumorales (67,68).

3. Xénogreffes après injection i.v.

De manière analogue aux xénogreffes i.p., l'injection i.v. permet la mise en place des interactions cellules tumorales/microenvironnement. Ces xénogreffes ont été réalisées en injectant les cellules tumorales de plusieurs lignées cellulaires dans la veine caudale de souris SCID (68). Les animaux sont surveillés afin d'observer leur aspect général et objectiver une éventuelle perte de poids qui pourrait refléter une éventuelle toxicité en cas de traitement.

4. Xénogreffes de cellules primaires de LCM

Cette technique dite *patient derived xenograft* (PDX) a été réalisée pour la première fois dans le modèle du LCM par Wang *et al.* (69). Des cellules primaires provenant de la rate, de la moelle osseuse et du sang périphériques de patients ont été isolées puis injectées dans des lamelles d'os. Ces lamelles ont été implantées s.c. chez des souris immunodéprimées SCID. Le dosage de β2-microglobuline a été utilisé pour monitorer la prise de greffe et la croissance tumorale. La prise de greffe et la croissance des cellules de LCM du patient sont dépendantes du microenvironnement de la moelle osseuse humaine contenu dans la lamelle d'os. Un marquage immuno-histochimique avec des anticorps anti-CD20 humain et anti-cycline D1 a

confirmé que les cellules de LCM étaient capables de survivre et de se propager dans le microenvironnement de la moelle osseuse des lamelles d'os humains mais aussi, de manière similaire à la pathologie humaine, de migrer dans les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse et le tractus gastro-intestinal de la souris hôte. S. Iyengar *et al.* (70), ont quant réalisé des PDX en injectant 10^7 cellules de patient dans des souris NSG au niveau de la veine caudale. Les auteurs ont utilisé la lignée JeKo1 modifiée afin d'exprimer la luciférase. Le suivi de l'implantation tumorale de cette lignée a été réalisé par mesure des photons de luminescence dans un après injection de luciferine dans les souris. La bioluminescence a été mesurée en comptant les photons par seconde, par centimètre^2, par radian (p/s/cm^2/r). Le modèle PDX a été validé par l'analyse en FISH (détection de la t(11;14)(q13;q32)) de suspensions cellulaires issues des rates des animaux greffés. D'autre part Zhao *et al.*(71) ont réalisé des PDX en injectant s.c. à la fois des cellules primaires de patients et des cellules stromales HK dans des souris NSG, montrant ainsi un effet bénéfique en terme de prise de greffe et de tumorogenèse.

L'ensemble de ces modèles sont nécessaires pour étudier la physiopathologie du LCM

C. Récepteurs aux œstrogènes

Comme dans la plupart des hémopathies malignes, il existe une différence de prévalence entre les hommes et les femmes avec un *sex-ratio* de 4 pour 1 en défaveur des hommes pour le LCM. L'imprégnation hormonale est la plus grande différence dans la physiologie des deux sexes, avec une production d'androgènes pour les hommes et d'œstrogènes pour les femmes. Des études ont montré que ces œstrogènes revêtaient un caractère protecteur vis-à-vis de la pathologie (72).

I. Les œstrogènes

Les œstrogènes appartiennent à une famille d'hormones qui présentent un squelette stéroïdien dérivant du cholestérol. Ce sont des hormones sexuelles féminines qui favorisent le développement des caractères sexuels secondaires et sont principalement sécrétées par les

ovaires. Les œstrogènes sont par ailleurs impliqués dans des processus physiologiques variés comme la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que le développement. Certains œstrogènes sont également produits en petite quantité dans le foie, les glandes surrénales, le tissu adipeux et le sein. Ces sites de production permettent à la femme ménopausée ainsi qu'à l'homme d'avoir une production d'œstrogènes, celle-ci étant tout de même minime. Cette production locale d'œstrogènes est obtenue par une conversion de la testostérone et de l'androstènedione en œstradiol par l'aromatase du cytochrome P450 (73). Physiologiquement, il existe 3 œstrogènes, l'estriol, l'estrone et le chef de file l'estradiol (E2), qui sont capables de se fixer sur deux types de récepteurs différents (ERs) : les récepteurs α et β (ERα et ERβ) (Figure 8).

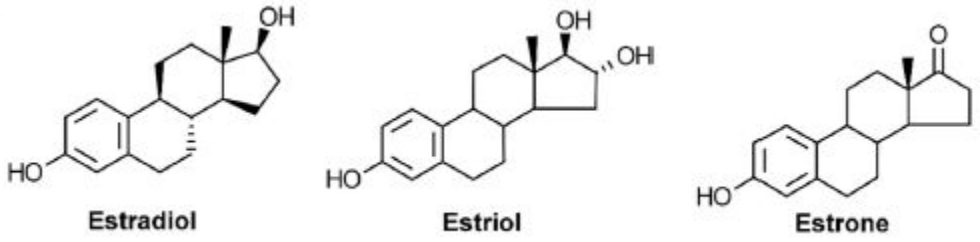


Figure 8 : Structures de l'estradiol, chef de file des œstrogènes, de l'estriol et de l'estrone. D'après (74).

II. Les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) comme tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire. Il contient six domaines structuraux (notés de A à F) composant cinq domaines fonctionnels, les domaines A et B ne présentant pas de fonctions distinctes (Figure 9) (75).

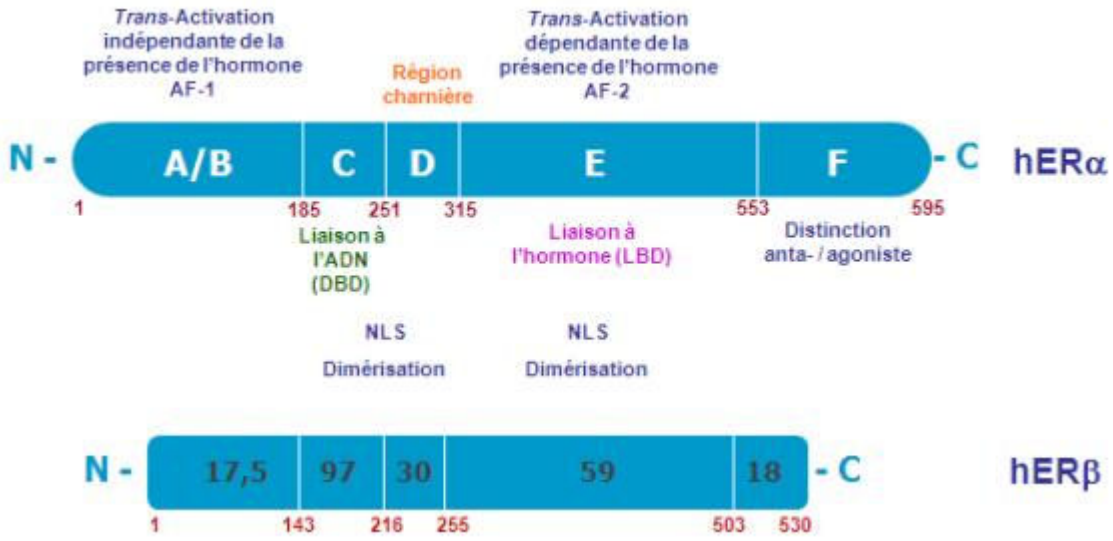


Figure 9 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux œstrogènes humains α et β. Les deux récepteurs humains possèdent 6 domaines structuraux (notés de A à F) mais seulement 5 domaines fonctionnels. Cette figure présente également le pourcentage d'homologie de séquence des différents domaines de ces deux récepteurs (chiffres noirs). Les chiffres rouges représentent la numérotation en résidus amino-acides dans la séquence. Abréviations : AF-1, *Activation Function*-1 ; AF-2, *Activation Function*-2 ; DBD, *DNA Binding Domain* ; LBD, *Ligand Binding Domain* ; NLS, *Nuclear Localization Site*. D'après (76).

Le domaine NH_2-terminal A/B présente la plus grande variété entre les 2 formes (17% d'homologie). Il est impliqué dans les interactions protéine/protéine et participe à l'activation des gènes cibles d'E2 par le recrutement de cofacteurs de transcription. Cette région présente un domaine de *trans*-activation, indépendant de la liaison à l'E2, dénommé AF-1 (*Activation function*). Ce domaine est responsable de l'activation constitutive de certaines cibles ; elles varient en fonction du type cellulaire ainsi que de l'isotype α ou β du récepteur (77).

Le domaine C est constitué d'une soixantaine d'acides aminés et est très largement conservé entre les deux isotypes (92% d'homologie). C'est le site de liaison à l'ADN ou DBD (*DNA binding domain*). Les ER, comme tous les récepteurs nucléaires, se lient à l'ADN sous

forme de dimères, c'est donc dans cette région que s'effectue la dimérisation au niveau de la boite distale ou D-box, seul élément de différence entre les 2 isotypes (78).

Le domaine D est la région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de fixation du ligand. L'importante flexibilité de cette région permet une rotation du DBD pouvant aller jusqu'à 180° afin de permettre au récepteur de s'adapter aux différents éléments de réponse aux œstrogènes (ERE). Cette région est aussi impliquée dans le recrutement des protéines chaperons, des co-activateurs et dans l'interaction avec le cytosquelette (79).

Le domaine E est un domaine possédant de multiples fonctions. Outre son rôle déterminant dans la fixation du ligand, il présente également une interface de dimérisation, une fonction de *trans*-activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2) ainsi que des sites de fixation de co-activateurs et des *heat-shock proteins* (HSP). C'est un domaine globulaire constitué d'environ 250 acides aminés et le second domaine le plus conservé entre les deux isotypes du récepteur aux œstrogènes (80).

Le domaine F est le domaine se situant à l'extrémité C-terminale du récepteur. Il est constitué par les 45 derniers acides aminés pour ERα et les 30 derniers pour ERβ et présente peu d'homologie de séquence (18% entre les deux isotypes). Il possèderait une activité répressive vis-à-vis de la dimérisation du récepteur et diminuerait par conséquent l'activité transcriptionnelle (81).

En plus des récepteurs sauvages complets, il existe différentes isoformes des deux sous-types de récepteurs qui sont issus d'épissage alternatif. Ces variants d'épissage sont retrouvés dans les cellules normales, dans les lignées tumorales et dans des échantillons de tumeurs primaires. La plupart de ces variants d'épissage ne lient pas les ligands des ER mais modifient l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvages. Leurs rôles restent cependant largement méconnus (82).

III. Le récepteur α aux œstrogènes

ERα est principalement exprimé dans les tissus reproducteurs comme l'utérus et l'ovaire mais aussi le sein, le rein, les os, le tissu adipeux et le foie. L'activation d'ERα a pour effet de stimuler la prolifération cellulaire au niveau des tissus, favorisant ainsi le risque de progression

tumorale. ERα possède également une activité anti-apoptotique avec des effets neuroprotecteurs (73). De nombreux cancers présentent une dépendance aux œstrogènes, en particulier ceux du sein et de l'endomètre et des thérapies anti-hormonales (comme le tamoxifène) sont ainsi proposées aux patients.

IV. Le récepteur β aux œstrogènes

ERβ est codé par le gène *ESR2* en 14q, c'est une protéine de 530 acides aminés (Figure 10). Il est exprimé principalement dans les ovaires, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, les poumons, la prostate, le côlon, le rein et dans le système immunitaire. L'activation de ce récepteur inhibe la prolifération cellulaire et stimule la différenciation des cellules de prostate, de la glande mammaire, du côlon, du poumon et des cellules souches hématopoïétiques. ERβ agit donc comme un suppresseur de tumeur. ERβ est également capable de stimuler l'apoptose, ces effets ont été décrits notamment sur des cellules de cancer de la prostate et des ovaires (73). Dans les LB, contrairement aux LT, ce sous-type de récepteur est très largement dominant. Les effets protecteurs observés des œstrogènes sont donc ceux apportés par les ERβ, ce qui pourrait expliquer l'incidence moindre de cette pathologie chez les femmes.

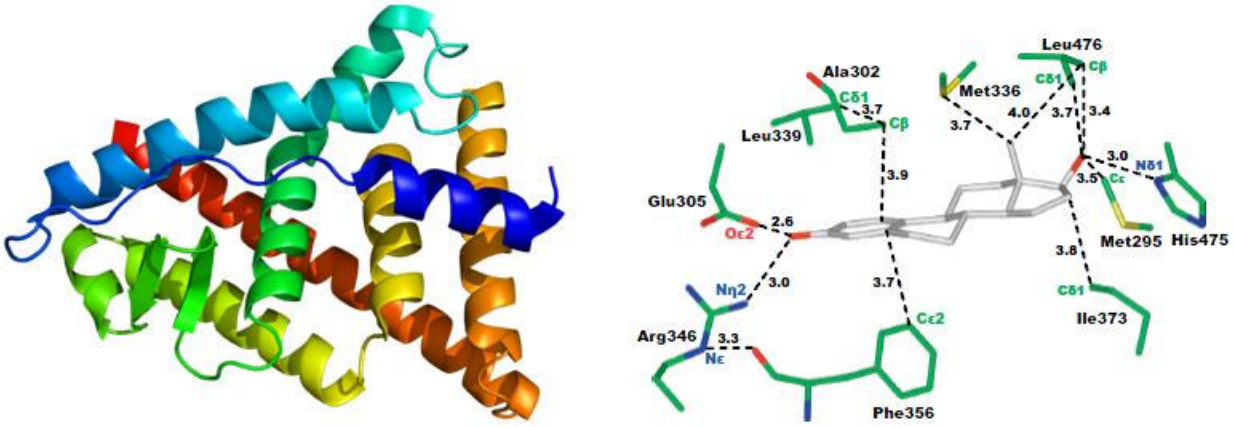


Figure 10. Structure du récepteur ERβ et interaction de E2 au niveau du site actif du récepteur. ERβ se lie au cycle A du squelette stéroïdes par les résidus Glu-305, Arg-346, Phe-356 et Ala-302 ; au cycle D par les résidus His-475, Leu-476, Met295 and Ile-373 et au groupe méthyl en position C18 par contact avec Met-336. La cohésion du site actif est permise par la liaison du résidu Ala-302 de l'hélice 3 avec le résidu Leu-339 de l'hélice 5. D'après (83).

V. Les ER dans la lymphopoïèse

Les deux sous-types de récepteurs sont retrouvés au niveau de l'ARN messager et au niveau protéique dans les PBMC ainsi que dans les polynucléaires neutrophiles. Il existe cependant des différences subcellulaires. Ainsi les LT CD4+ expriment principalement ERα contrairement aux cellules B qui expriment davantage ERβ. Les LT CD8+, quant à eux, expriment de manière équivalente mais plutôt faiblement les deux sous-types de récepteurs. De manière analogue à l'expression physiologique, plusieurs hémopathies B comme la LLC, le LH, le lymphome de Burkitt et le myélome multiple (MM) expriment abondamment la protéine ERβ alors que l'expression d'ERα est très faible voire indétectable. L'expression des deux sous-types a également été détectée dans les lymphocytes NK (73). L'expression relative des deux sous-types de récepteur au niveau messager et/ou protéique est montrée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Expression des ERα et ERβ dans les différents types cellulaires du système immunitaire. D'après (73).

Expression of ERα and ERβ in different immune cell types.

Immune cell type	Expression of ERα	Expression of ERβ
$CD4^+$ T cells	+, high (mRNA)	+/−, low (mRNA)
$CD8^+$ T cells	+, low (mRNA)	+, low (mRNA)
B cells	+/−, low (mRNA)	+, high (mRNA)
NK cells	+/−, low (mRNA)	+(mRNA)
	+(protein)	+(protein)
Monocytes	+(mRNA)	+(mRNA)
	−(protein)	+(protein)
Macrophages	+(protein)	−(protein)
Dendritic cells	+(protein)	+(protein)

VI. Les agonistes de ERβ

Il existe plusieurs agonistes spécifiques d'ERβ, le mieux caractérisé étant le diarylpropionitrile (DPN). Il fait partie de la catégorie des agonistes *binders/activators* qui montrent une affinité 70 fois supérieure pour ERβ que pour ERα, et qui activent de manière plus importante ERβ que ERα (84).

L'ERB-041 est un agoniste de deuxième génération qui se montre 200 fois plus sélectif pour ERβ que ERα. Ce composé est inactif sur plusieurs fonctions classiques des œstrogènes liés à ERα (mammogenèse, ostopénie, inhibition de l'ovulation) et présente une activité puissante dans deux modèles d'inflammation de la vessie et des articulations chez le rat grâce à son activité sur les cellules immunitaires. Le mécanisme d'action au-delà de son action sur le récepteur reste à déterminer (84). Les structures chimiques de ces deux molécules sont présentées en Figure 11.

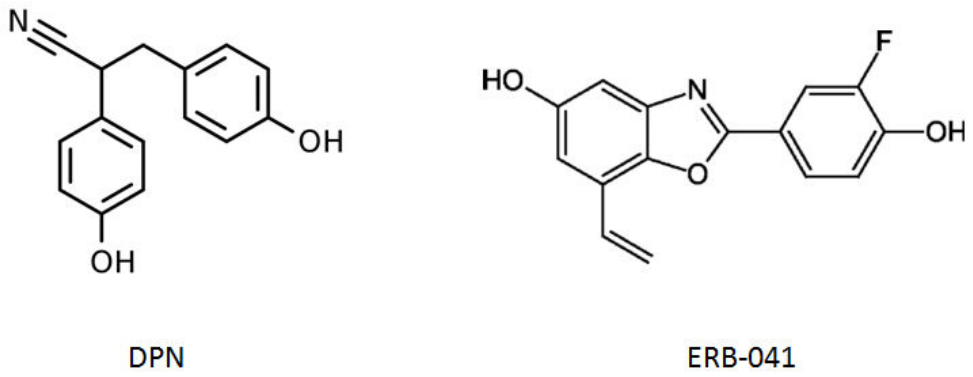


Figure 11. Structure moléculaire de deux agonistes spécifiques de ERβ, DPN et ERB-041. D'après (85).

D. Rôles physiologiques et oncogéniques de cycline D1

Il existe trois cyclines D différentes dans les cellules de Mammifères, les cyclines D1, D2 et D3 (86). Chacune d'elle est capable de s'associer avec les CDK4/6 pour ainsi former un complexe holoenzymatique capable de phosphoryler ses cibles. Certaines de leur fonctions sont redondantes, d'autres en revanche sont uniques. L'utilisation d'animaux invalidés (KO : *knock-out*) pour chacune des cyclines D ou d'une combinaison de cyclines D a permis de mieux comprendre leurs rôles respectifs. Dans le cas d'un KO *CCND1*, on observe des défauts de développement des glandes mammaires lors de la gestation, des malformations de la rétine, des anomalies neurologiques et une stéatose hépatique (87). Dans le cas d'un KO *CCND2*, les souris sont embryologiquement viables, comme dans le cas des KO *CCND1*, laissant ainsi supposer des rôles équivalents dans le développement du fœtus. Par ailleurs, chez la souris adulte, on observe une altération de la prolifération des cellules gonadiques associée à une infertilité. La cycline D2 est indispensable aux signaux de prolifération de la granulosa provoquée par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (88). La cycline D2 pourrait également posséder une activité suppresseur de tumeur. En effet, son expression est perdue dans la majorité des cancers du sein (88). Dans le cas d'un KO *CCND3*, on observe un défaut dans le développement des LT, dans la maturation des LB et dans la production de polynucléaires neutrophiles (PNN). Les souris *CCND3*$^{-/-}$ montrent une susceptibilité réduite aux tumeurs malignes T, ainsi, la prolifération de cellules de leucémies lymphoblastiques dérivant de LT immatures est inhibée par l'extinction de cycline D3 (89). Dans la suite de notre exposé, nous nous concentrerons uniquement sur la cycline D1 qui est au cœur de la physiopathologie du LCM.

I. Structure et régulation de cycline D1

1. Structure du gène

La cycline D1 est codée par le gène *CCND1* qui se situe sur le bras long du chromosome 11 en 11q13, il est composé de 5 exons et de 4 introns (Figure 12). Sa taille est de 13 388 paires

de bases. Il est exprimé dans tous les tissus humains adultes à l'exception des cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes (90).

2. Structure de l'ARN messager

Il existe un polymorphisme (A/G) fréquent dans le dernier codon (870) de l'exon 4 de *CCND1*. Bien que ce changement de base ne modifie pas l'acide aminé concerné, la base fait partie intégrante du site du donneur d'épissage entre l'exon 4 et l'intron 4. L'allèle G870 crée un site de donneur d'épissage optimal, ce qui entraîne la transcription de la forme longue de l'ARNm codant pour la forme longue canonique de la protéine cycline D1 (transcrit a). En revanche, l'allèle A870 diminue l'événement d'épissage, ce qui permet une lecture dans l'intron 4 et la production d'un produit d'épissage variant de la cycline D1, appelé transcrit b (Figure 12). Ces allèles sont incomplètement pénétrants et en pratique, les deux formes d'épissage coexistent dans les cellules, même quand les allèles sont homozygotes (Figure 12).

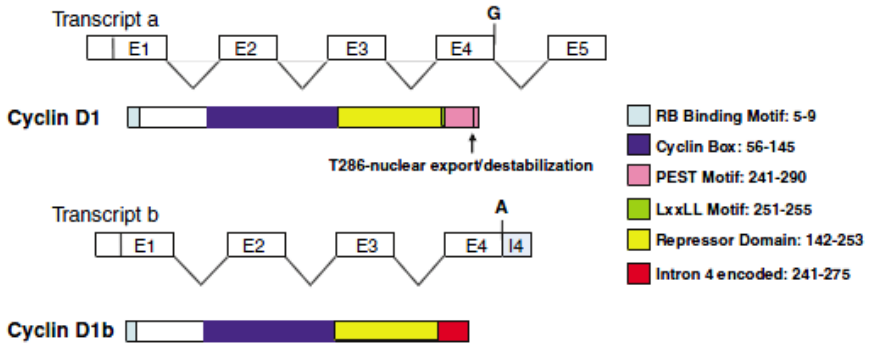


Figure 12. Structure des formes longue (a) et courte (b) de cycline D1. Les transcrits a et b ainsi que les protéines correspondantes avec leurs domaines fonctionnels : *RB binding motif*, *cyclin-box,* motif *PEST,* motif LxxLL et le *repressor domain*, sont représentés. D'après (91).

3. Structure de la protéine

Cycline D1 possède 295 acides aminés (Figure 13) et est constituée de différents domaines : un motif de liaison à RB1, une boite cycline (*cyclin-box*) pour la liaison avec CDK4/6, un motif LxxLL qui est important pour le recrutement de cofacteurs nécessaires à l'activation de la transcription. Ce motif est assez semblable au domaine riche en leucine retrouvé dans la famille des récepteurs nucléaires (dont font partie les récepteurs aux oestrogènes) et permet également la liaison de coactivateurs (92). La séquence PEST qui contrôle la dégradation de la protéine et un résidu thréonine (T286) qui contrôle l'export nucléaire et la stabilité de la protéine (91). Cycline D1b ne possède plus l'exon 5 qui code pour une séquence polypeptidique riche en proline (P), acide glutamique (E), serine (S) et thréonine (T) (PEST). Cette séquence PEST est notamment impliquée dans les mécanismes de dégradation de cycline D1. La forme courte possède, elle, en revanche une partie de l'intron 4 (93). Paradoxalement, alors que la forme cycline D1b ne possède plus la séquence de dégradation PEST, la demi-vie des 2 variants n'est pas significativement différente (91), suggérant ainsi d'autres mécanismes de dégradation que l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. Il a cependant été montré que la cycline D1b possédait un plus fort potentiel oncogénique que la cycline D1a (91). Pour le reste de l'exposé nous nous focaliserons sur la forme la plus fréquente de cycline D1 à savoir la cycline D1a.

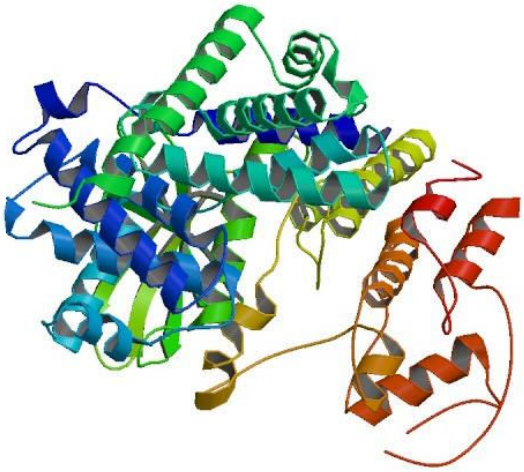


Figure 13 : Structure de CDK4 complexé avec une cycline D1. Structure 3D de cycline D1 (bleu/vert) en association avec CDK4 (jaune/rouge). D'après (94).

4. Localisation subcellulaire

4.1. Import nucléaire

Après sa phase de synthèse dans le cytoplasme, la cycline D1 ne possède pas, elle même de signal d'adressage nucléaire. C'est son association durant la phase G1 du cycle cellulaire avec CDK4/6 qui lui permet de s'accumuler dans le noyau. (95).

4.2. Exportation cytoplasmique et rôle d'XPO1

La cycline D1 se relocalise ensuite, durant la phase S au niveau du cytoplasme grâce à l'action de l'exportin 1 (XPO1) aussi nommé CRM1 (chromosomal maintenance 1). XPO1 est une protéine d'export nucléaire clé qui transporte une large gamme de protéines du noyau vers le cytoplasme, cycline D1 fait partie de ces protéines. Les protéines qui sont ainsi exportées par XPO1 sont nommées les protéines « cargo ». XPO1 est un membre de la superfamille importin-β des karyophérines qui interviennent dans la translocation de nombreux ARN et protéines de régulation cellulaire, y compris les protéines suppresseurs de tumeur, telles que p53, BRCA1 *(breast cancer 1)*, survivine, nucleophosmin, APC (*adenomatous polyposis coli)* et FOXO (*Forkhead box O)* (96).

4.2.a. Mécanisme d'action

Afin que XPO1 puisse se lier à ses protéines cargo, des modifications de la conformation tridimensionnelle de XPO1 sont nécessaires. Ces modifications nécessitent la liaison de RanGTP (*Ras related nuclear protein*), une petite protéine G. RanGTP est formée dans le noyau par conversion de RanGDP par l'action de RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*), qui est attachée à la chromatine. Ainsi, le sillon hydrophobe de XPO1 peut se lier au domaine du signal d'export nucléaire (NES) riche en leucine des protéines cargo. Le complexe ternaire ainsi formé est stable et permet l'exportation vers le cytoplasme de XPO1 et de la protéine cargo associée en empruntant le pore nucléaire (NPC : *nuclear pore complex*). Une fois dans le cytoplasme, le complexe se dissocie après la déphosphorylation de RanGTP, libérant ainsi la protéine cargo. En effet RanGTP est déphosphorylée par une GTPase qui est activée par RanGAP et cette protéine RanGAP est liée au côté cytoplasmique du NPC. Une fois le complexe dissocié, XPO1 est recyclé dans le noyau pour d'autres cycles d'exportation. Le transport des complexes

XPO1/RanGTP/cargo du noyau vers le cytoplasme est donc permis par un gradient RanGTP-RanGDP qui est maintenu à travers la membrane nucléaire en raison de la localisation sous-cellulaire des régulateurs Ran (96) (Figure 14).

La liaison entre cycline D1 et le sillon hydrophobe de XPO1 est permise après la phosphorylation de cycline D1 au niveau de la Thr286 par la GSK-3β *(glycogen synthase kinase 3β)* ainsi qu'au niveau de la Thr288 par DYRK1B *(dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B)* (97).

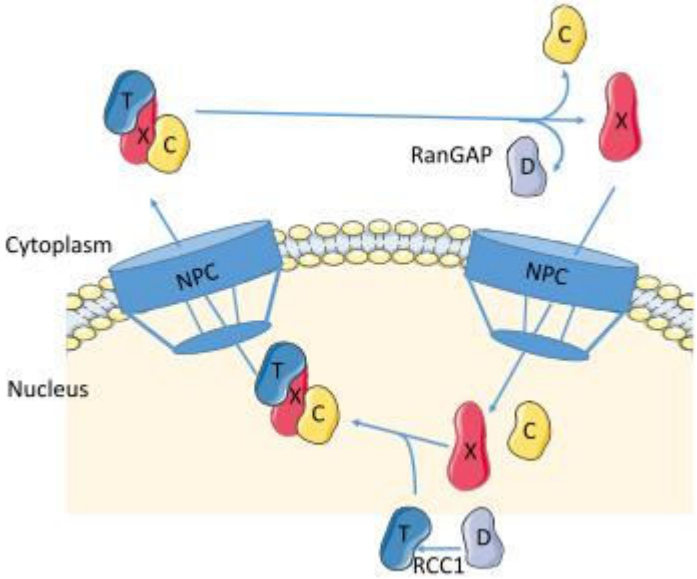


Figure 14 : Représentation schématique de l'export nucléaire contrôlé par XPO1. RanGDP (D) est convertie en RanGTP (T) par l'action de RCC1 (*Ran guanine exchange factor*). Le complexe d'exportation composé de RanGTP, de la protéine cargo (C) et de XPO1 (X), transite par le complexe de pores nucléaires (NPC). Dans le cytoplasme RanGTP est déphosphorylée par l'action de RanGAP, la protéine activant Ran GTPase. Les complexes cargo/XPO1 sont dissociés et XPO1 retourne au noyau pour d'autres cycles d'exportation nucléaire. D'après (96).

4.2.b. Inhibiteurs d'XPO1

XPO1 est hyperactive dans de nombreux cancers, et ainsi, XPO1 a été considérée comme une cible potentielle anticancéreuse depuis des décennies. Il existe des inhibiteurs spécifiques de XPO1 appelés *selective inhibitor of nuclear export* (SINE), on retrouve parmi eux le KPT-330. Le KPT-330 ou Selinexor® produit par l'entreprise Karyopharm™, est le premier antagoniste

d'XPO1 utilisable *per os*, à avoir été évalué dans plusieurs essais cliniques avancés pour des patients présentant tumeurs solides ou hématologiques en rechute ou résistantes aux thérapies standards. Il agit en se liant de manière covalente au résidu Cys528 se trouvant dans le sillon hydrophobe d'XPO1, empêchant ainsi la liaison de la protéine cargo à XPO1 (98). La formule chimique du KPT-330 est présentée Figure 15.

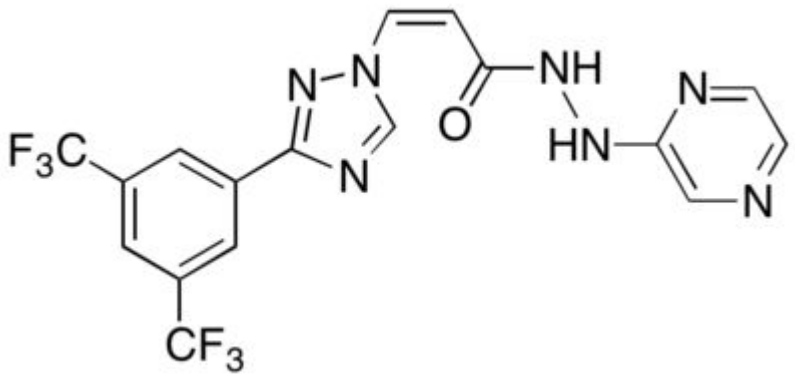


Figure 15 : Structure chimique du KPT-330 : Le KPT-330 est un inhibiteur spécifique et irréversible de XPO1. D'après (98).

4.3. Différences de localisation en fonction du sous type de cycline D1

Alors que la cycline D1a est retrouvée physiologiquement à la fois au niveau nucléaire et cytoplasmique, la cycline D1b, ne possédant pas l'exon 5 ne possède pas le signal d'exportation nucléaire et se retrouve donc presque exclusivement dans le noyau (99).

5. Régulation de l'expression de cycline D1

Le gène *CCND1* codant pour cycline D1 est étroitement régulé au niveau transcriptionnel par une variété de voies de signalisation, mais aussi au niveau post-transcriptionnel *via* la modulation de l'épissage et de la stabilité de l'ARNm et enfin au niveau protéique par la régulation de la stabilité de la protéine et de sa dégradation (100).

5.1. Régulation au niveau transcriptionnel

Physiologiquement, l'expression de cycline D1 est induite par des signaux extrinsèques : facteurs de croissance et notamment *l'insulin like growth factor I et II* (IGF-I et IGF-II), des acides aminés, des hormones, l'acide rétinoïque, l'acide lysophosphatydique, le ligand du récepteur

activateur de prolifération du peroxysome PPARγ, des facteurs secrétés par les adipocytes, et la gastrine (hormone gastrointestinale). Chacun de ces facteurs régule l'expression de cycline D1 dans des tissus spécifiques (101).

GSK-3β (*glycogen synthase kinase* 3β*)* joue aussi un rôle important dans la régulation de l'expression de cycline D1 (Figure 16). Lorsque cette protéine est activée par phosphorylation au niveau Ser9, elle va activer la phosphorylation de β-caténine qui est également un facteur régulant la transcription de *CCND1*. En effet l'activité du promoteur de Cycline D1 est fortement augmentée de manière dose dépendante, en réponse à β-caténine. Dans le promoteur de *CCND1*, un site de liaison de consensus TCF (*T Cell Factor*) se situe de -81 à -75 pb. 3 autres sites ressemblant étroitement au site TCF se situent à -74/-68, -33/-27 et -21/-15 pb. Ces quatre sites de liaison TCF sont responsables de l'induction de cycline D1 par β-caténine. La séquence consensus de TCF n'existe pas dans les promoteurs de cycline D2, cycline D3 et cycline E, ni existe dans des CDK, tels que CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 et CDK7. Ainsi *CCND1* est considéré comme un gène cible de signalisation Wnt (*Wingless integration site*)/β-caténine (102).

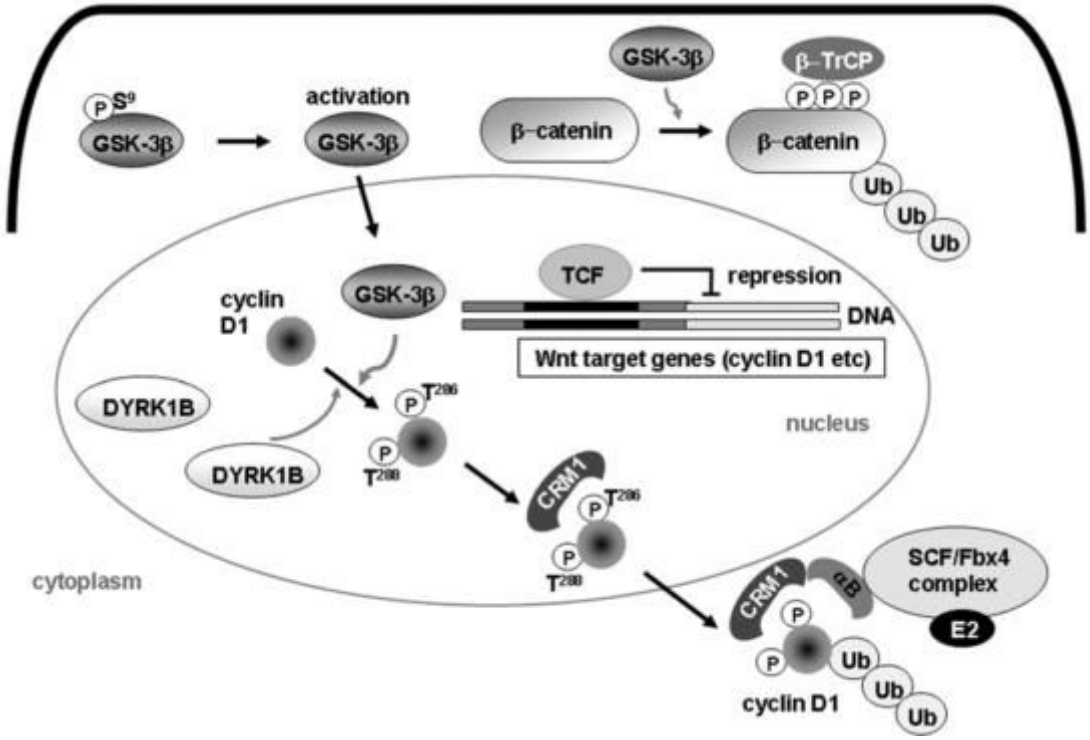


Figure 16 : Rôle de GSK-3β dans la régulation de l'expression de cycline D1. GSK-3β est activée par déphosphorylation de Ser9. GSK-3β activée est transloquée dans le noyau et phosphoryle la Thr286 de cycline D1. Cycline D1 est également phosphorylée sur la Thr288 par DYRK1B, qui est présent dans le noyau. La cycline D1 phosphorylée est exportée du noyau par XPO1 (aussi nommé CRM1) et dégradée par le système protéasome 26S après son ubiquitination catalysée par le complexe αB-cristalline-SCFFBX-4. GSK-3β active également la phophorylation de β-caténine dans le cytoplasme. La β-caténine phosphorylée est dégradée, entraînant l'inhibition de la transcription de gènes cibles tels que CCND1 et cMYC. Abréviations : GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) ; DYRK1B (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B) ; SCF (Skp1/Cul1/F-box protein) ; FBX4 (F-box only protein 4) ; β-TrCP (β-transducin repeat-containing protein); Ub (ubiquitin). D'après (102).

5.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel

En plus de la régulation transcriptionnelle, la cellule emploie un vaste panel de mécanismes post-transcriptionnels qui peuvent rapidement moduler l'activité de cycline D1 pour permettre une progression dans le cycle cellulaire appropriée en fonction du contexte. Un des acteurs de cette régulation est la protéine SNIP1 (*smad nuclear interacting protein 1*) (100). SNIP1 permet la stabilisation de l'ARNm de cycline D1 après l'épissage, elle est recrutée avec d'autres co-facteurs au niveau de la région 3'-UTR (non traduite : *untranslated region*) de

l'ARNm de cycline D1. Elle est également essentielle pour le recrutement de U2 AF65 *(U2 small auxiliary factor 65)* qui contrôle les mécanismes d'épissage. L'échec du recrutement de U2AF65 en absence de SNIP1 déstabilise l'ARNm naissant de cycline D1, provoquant un échec de son épissage et sa dégradation prématurée (103). SNIP1 est surexprimée dans plusieurs cancers et favorise les propriétés oncogéniques d'autres protéines comme c-Myc et H-Ras(104).

Par ailleurs, la région 3'UTR (*untranslated region*), de cycline D1 intervient également dans la régulation post transcriptionnel du gène. En effet des micro ARN de la famille miR-15/16 et miR17-92 ciblent directement cette région 3'UTR provoquant la dégradation de l'ARNm et donc inhibant la production protéique (105).

5.3. Régulation de la dégradation

5.3.a. Exportation nucléaire

Le niveau de cycline D1 diminue au cours de la phase S du cycle cellulaire à cause d'une diminution de la stabilité de la protéine (Figure 17). La diminution du taux de cycline D1 est nécessaire pour la réplication de l'ADN durant la phase S, en effet cycline D1 se lie au *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) et à CDK2, inhibant directement la synthèse de l'ADN et bloquant ainsi la cellule en phase S (106). Afin d'être dégradée, cycline D1 nucléaire doit tout d'abord être exportée au niveau cytoplasmique, comme nous venons de le détailler Figure 13, la phosphorylation de cycline D1, permet son export par XPO1

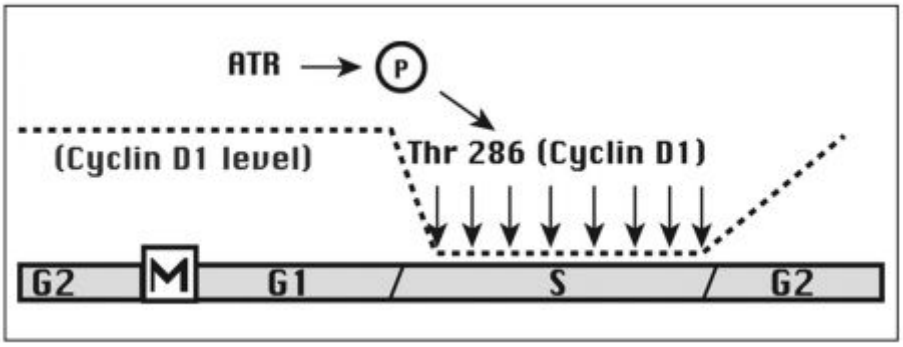


Figure 17 : Expression cyclique de cycline D1 au cours du cycle cellulaire. Ce diagramme représente la progression à travers les phases successives du cycle cellulaire, avec le niveau de cycline D1 indiqué en pointillé. Le niveau élevé de cycline D1 pendant la phase G1 permet à la cellule d'entrer en phase S. La kinase de point de contrôle ATR est activée par la synthèse de l'ADN

et favorise la phosphorylation de Thr 286 sur la cycline D1. Cette phosphorylation entraîne une dégradation protéasomale rapide de cycline D1 tant que la synthèse de l'ADN se poursuit. À la fin de la phase S, cependant, la phosphorylation active de la cycline D1 cesse, et les niveaux de cycline D1 se stabilisent. D'après (107).

5.3.a. Ubiquitination cytoplasmique

Suite à l'export cytoplasmique par XPO1 de cycline D1, la protéine est poly-ubiquitinée. L'ubiquitine est une protéine de 76 aa qui sert de signal de reconnaissance pour la dégradation par un mécanisme que l'on appelle complexe ubiquitine/protéasome. L'ubiquitine est fixée à la protéine à détruire par une liaison covalente entre l'un des résidus glycine de sa partie C-terminale et un groupement NH2 d'une lysine de la protéine ciblée. D'autres ubiquitines peuvent alors se fixer à un résidu lysine de la première ubiquitine pour former une chaîne dite poly-ubiquitine. Ces opérations de poly-ubiquitination sont réalisées par trois types d'enzymes (notées E1, E2 et E3) :

- l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) qui active l'ubiquitine en consommant de l'ATP, pour former une liaison thiolester entre un résidu Cys de son site catalytique et l'ubiquitine. Une fois activée l'ubiquitine est transférée sur l'enzyme E2.

- l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2), qui modifie l'ubiquitine en formant une liaison thiolester. Cette E2 est capable d'attacher l'ubiquitine à la protéine cible avec l'aide d'une enzyme E3.

- l'ubiquitine ligase (E3), joue un rôle dans la reconnaissance et la liaison entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles (Figure 18).

Seules les protéines liées à une chaîne d'au moins quatre molécules d'ubiquitine sont reconnues par le protéasome. Après avoir été enlevée par le protéasome, la chaîne de polyubiquitine est découpée pour être réutilisée. La mono-ubiquitination des protéines est également impliquée dans d'autres processus dont l'endocytose, l'exocytose ainsi que l'autophagie (108).

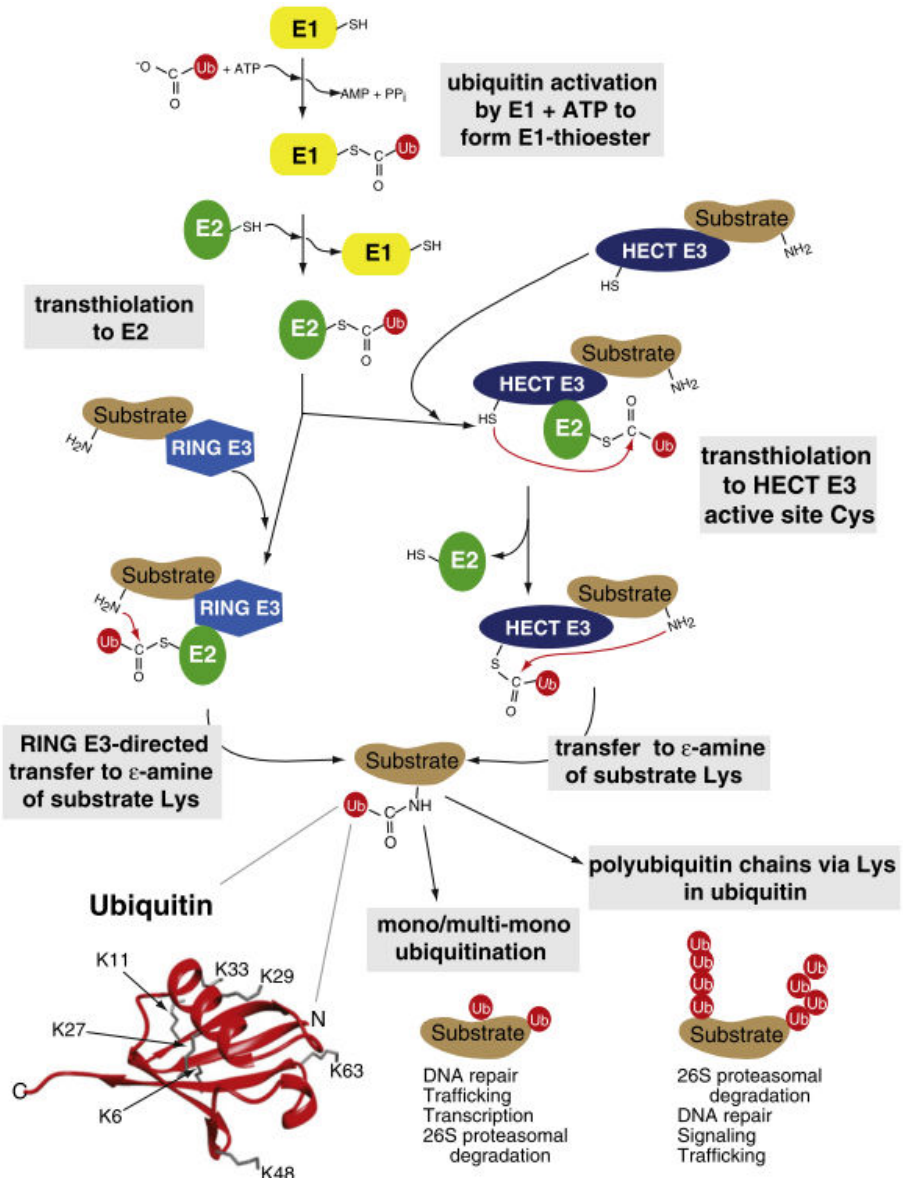


Figure 18 : L'ubiquitination des protéines nécessite l'action séquentielle de trois classes d'enzymes. Premièrement, l'ubiquitine (Ub) est activée de manière dépendante de l'ATP par E1. Dans cette étape, l'extrémité C de l'ubiquitine est liée par une liaison thioester au site actif Cys de E1 (E1 ~ Ub). L'ubiquitine est ensuite transthiolée sur le site actif Cys d'une enzyme de conjugaison d'ubiquitine (E2), générant un E2 ~ Ub thioester. E3 interagit alors avec E2 ~ Ub et le substrat auquel l'ubiquitine doit être transférée. Il existe 2 type de E3 : les E3 de type HECT fonctionnent comme intermédiaires covalents dans la voie de l'ubiquitination car l'ubiquitine est d'abord transférée sur le site actif Cys de E3 par une transthiolation avant la conjugaison au substrat. Les E3 de type RING permettent de transférer l'ubiquitine directement à partir d'E2 ~ Ub vers le substrat. L'ubiquitine peut être transférée sur d'autres molécules d'ubiquitine générant ainsi des chaînes multi-poly-ubiquitines, et régissant dans une large mesure, le destin et la fonction de la protéine modifiée. D'après (109).

5.3.a. *Dégradation par le protéasome 26S*

Une fois poly-ubiquitinée, cycline D1 va être dégradée dans le protéasome 26S. Le protéasome 26S est un complexe enzymatique multiprotéique dont la fonction principale est la dégradation par protéolyse des protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes. Les protéines ainsi dégradées sont transformées en fragments de 7 à 9 aa qui seront recyclés hors du protéasome par hydrolyse. Le protéasome 26S, le plus répandu, a une masse moléculaire de 2 000 kDa et est nommé ainsi à cause de son coefficient de sédimentation de Svedberg (noté S). Il est composé d'un cœur catalytique 20S et de 2 complexes régulateurs 19S, positionnés symétriquement l'un par rapport à l'autre. Le cœur catalytique 20S possède une forme de baril et présente une cavité en son centre qui contient le site actif. Le complexe 19S est constitué de 17 protéines distinctes et sert à reconnaitre la chaine de poly-ubiqutine (Figure 19). Le protéasome joue donc un rôle très important dans la dégradation de nombreuses protéines, y compris la cycline D1 et permet de recyclage des protéines pour des utilisations ultérieures.

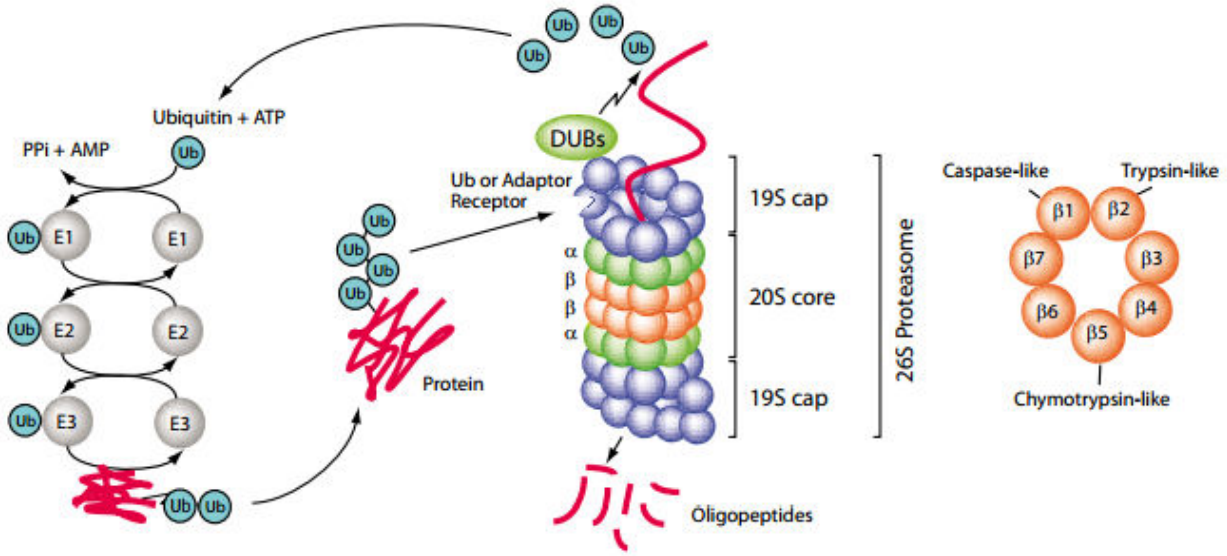


Figure 19 : Dégradation des protéinespar le protéasome. Les protéintes polyubiquitinées (cf Figure 18), sont dégradées par le protéasome 26S, celui-ci est composé de deux sous unités 19S chargé de la reconnaissance des protéines à dégrader et d'une unité centrale 20S reponsable de la dégradation de la protéine en oligopeptides. Cette unité 20S possède dans ses feuillets β, 3 types d'activités enzymatiques différentes : des activités *caspase like, trypsin like* et *chymotrypsin like*. D'après (110).

L'ensemble des mécanismes de régulation de la cycline D1, sont présentés Figure 20.

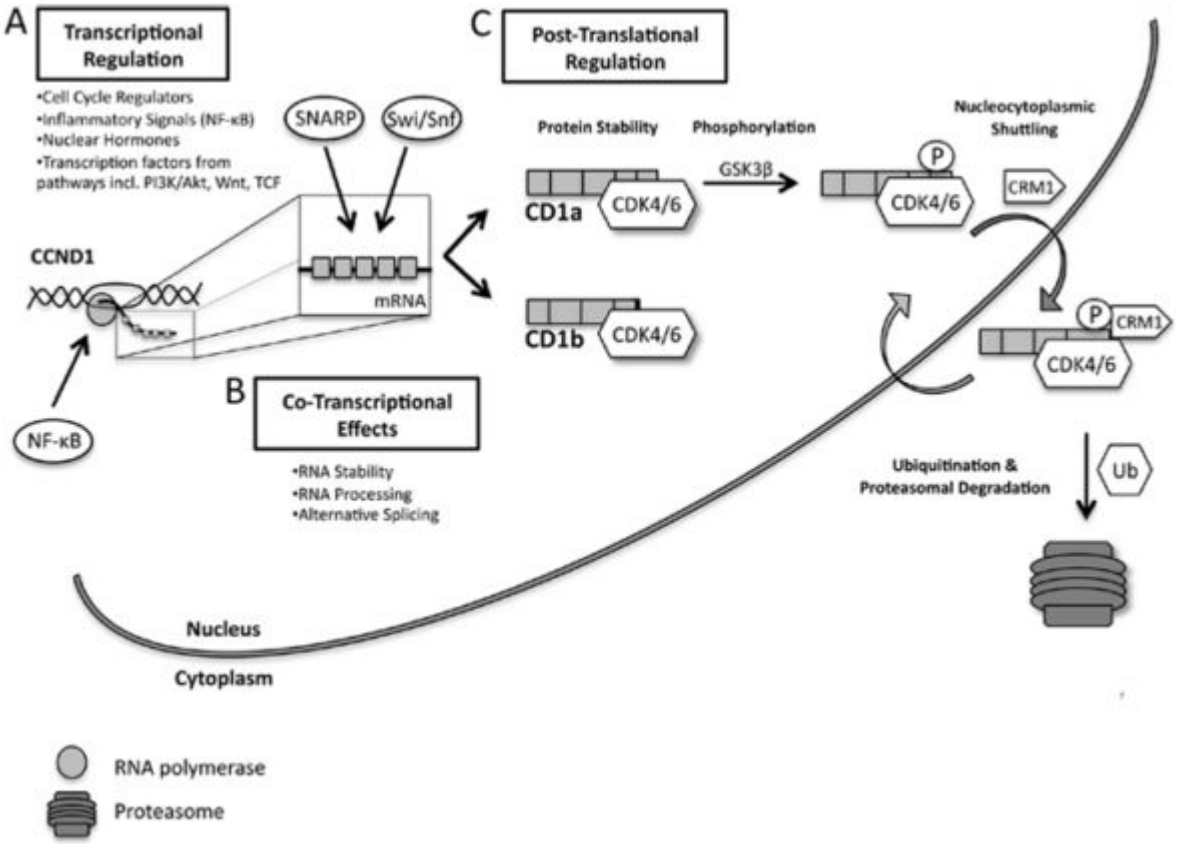


Figure 20 : Régulation de cycline D1 : A. De nombreuses voies de signalisation convergent vers le promoteur de *CCND1* activant ainsi sa transcription et permettant la progression dans le cycle cellulaire. Les sous unité NF-κB peuvent faire partie des complexes répresseurs ou activateurs qui lient le promoteur cycline D1. **B.** La régulation post-transcriptionnelle ainsi que l'épissage influent sur la stabilité de l'ARNm et donc sur l'expression génique, dans une proportion encore plus importante que la régulation effectuée sur le promoteur du gène. SNIP1 et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF sont connus pour jouer un rôle dans cette étape. **C.** Seule l'isoforme longue CD1a peut être phosphorylée par GSK3β sur Thr286, cela permet l'interaction avec l'exportine XPO1/CRM1 et la poly-ubiquitination provoquant la dégradation *via* le protéasome dans le cytoplasme. CD1b ne possèdant pas la Thr286 n'est pas exporté dans le cytoplasme et est constitutivement nucléaire. Cette forme peut subir cependant une dégradation nucléaire. D'après (100).

II. Fonctions physiologiques de la cycline D1

1. En association avec CDK4/6

1.1. Contrôle du cycle cellulaire

Comme présenté dans la partie A. III. 1., la fonction la plus connue de la cycline D1 est le contrôle du cycle cellulaire en permettant la transition de la phase G1 à la phase S. Physiologiquement, cycline D1 est par ailleurs exprimée dans toutes les cellules sauf dans les lymphoïdes et myéloïdes.

1.2. Contrôle du métabolisme

La cycline D1 est une cible de l'insuline et provoque ainsi un effet hypoglycémiant. L'insuline est une hormone majeure dans le maintien de l'homéostasie du glucose. Un de ses rôle est d'inhiber la transcription du *peroxysome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1* α (PGC-1α) dont le rôle est de favoriser l'expression des gènes du métabolisme du glucose et des lipides, notamment de la néoglucogenèse dans les hépatocytes. L'activité de PGC-1α est régulée négativement par l'histone acétyltransférase GCN5 (*general control non-repressed 5*) qui acétyle PGC-1α supprimant ainsi son activité transcriptionnelle (111).

Dans un modèle *in vivo* murin d'un régime riche en lipide (60 % des apports caloriques), l'insuline est capable d'activer les complexes cyclines D1/Cdk4, qui en retour, augmentent l'activité acétyltransférase de GCN5 et diminuent ainsi la production de glucose hépatique induite par PGC-1α et ce, de manière indépendante du cycle cellulaire. Des travaux ont montré, que la perte de cycline D1 au niveau hépatique augmentait la néoglucogenèse et entrainait une hyperglycémie. De plus, on retrouve dans des modèles de souris diabétiques, une augmentation du nombre de complexes cycline D1/Cdk4 de manière chronique mais ils sont réfractaires aux transitions jeûne/alimentation et donc inactifs sur PGC-1α (112).

1.3. Contrôle de la différenciation

Il a été montré que le complexe cycline D1/CDK4 est capable de phosphoryler Smad3, un composant de la cascade du *transforming growth factor* β (TGFβ), inhibant ainsi son activité et permettant la poursuite du cycle cellulaire (113). La superfamille du TGFβ est constituée d'un

grand groupe de facteurs croissance polypeptidiques sécrétés comme le TGFβ ou l'activine , qui se lient aux récepteurs de type I et II. La cascade de signalisation TGFβ/activine est propagée *via* la phosphorylation de Smad 2 et Smad3 par ces récepteurs. Smad2 et Smad3 forment alors un complexe avec Smad4. Ce complexe s'internalise dans le noyau et avec l'aide de coactivateurs et des facteurs spécifiques de liaison à l'ADN, régule l'expression de gènes cibles contrôlant notamment la croissance cellulaire et la différenciation (114).

1.4. Contrôle de la sénescence

Il a été montré que dans l'épithélium mammaire, cycline D1 est capable de diminuer l'autophagie des cellules et par ce biais, favorise l'entrée des cellules en sénescence. En effet, l'utilisation de cellules épithéliales mammaires (MEC) déficientes en cycline D1 pouvant s'associer à CDK4 (*cyclin D1*$^{KE/KE}$) augmente les processus autophagiques et inhibe la sénescence induite par ErbB2 *in vivo*. L'inhibition conjointe de CDK4/6 et de l'autophagie dans les MEC provoque une augmentation de la sénescence associée (115).

2. Indépendamment de CDK4/6

Additionnellement aux fonctions dépendantes des CDK, cycline D1 présente des rôles propres.

2.1. Contrôle de la réparation de l'ADN

Il a été montré que cycline D1 faisait partie intégrante du complexe de réparation RAD51-BRCA2 qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (RH). Dans la cellule normale, l'expression de cycline D1 est inhibée en absence de dommages à l'ADN, BRCA2 est phosphorylée en position S3291 par les complexes cyclines A/B/CDK1/2 et la RH est inactive. A la suite des dommages à l'ADN dans une cellule normale, CDC25A est inhibée provoquant une inactivation des complexes cyclines A/B/CDK1/2 permettant ainsi l'expression de cycline D1. Cycline D1 se fixe alors sur BRCA2 et permet le recrutement de RAD51 et la recombinaison homologue (116).

2.2. Contrôle de la transcription

La cycline D1 forme des associations physiques avec plus de 30 facteurs ou cofacteurs de transcription (101). Parmi eux plusieurs récepteurs nucléaires comme le récepteur des androgènes (AR) (117), les récepteurs des œstrogènes (ER) (118), le récepteur de l'hormone thyroïdienne et le PPARγ (119), se lient directement à cycline D1 et sont régulés à la fois au niveau basal et après activation par leur ligands. Cycline D1 s'associe au complexe p300/*CBP associate factor* (CAF) et potentialise l'activation de ERα. Au contraire, cycline D1 réprime la signalisation des AR également en interagissant avec le complexe p300/CAF. Cycline D1 inhibe également directement PPARγ indépendament de son association avec CDK4/6 ou RB1 (cf. page 59 chapitre métabolisme des lipides). Il a également été démontré que cycline D1 s'associe au *TATA-box binding protein associated factor (II) 250* ($TAF_{II}250$) et supprime l'activité du facteur de transcription Sp1 médiée par RB1 (120).

2.3. Métabolisme des lipides

Cycline D1 inhibe l'activité de PPAR-γ et diminue ainsi les processus d'adipogenèse. PPAR-γ est le ligand de nombreux récepteurs nucléaires. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription importants de la régulation de l'homéostasie lipidique. PPARγ est particulièrement exprimé dans le tissu adipeux et agit en favorisant l'adipogenèse. Il a été montré, que cycline D1 inhibait les activités dépendantes de PPAR-γ par un mécanisme indépendant des CDK et de la liaison à RB1. Cette régulation de PPAR-γ dans les adipocytes nécessite le recrutement de HDAC et permet de réguler localement la structure de la chromatine des cibles de PPAR-γ. Les facteurs de transcription ainsi inhibés diminuent les processus d'adipogenèse (121).

2.4. Respiration mitochondriale

Les mitochondries sont des organites responsables d'une grande partie de la production d'énergie dans les cellules. Il se produit au niveau de la chaine respiratoire, la phosphorylation oxydative de nucléotides diphosphates en nucléotides triphosphates, et plus particulièrement de l'ATP. Cet ATP peut diffuser vers le cytoplasme via le canal anionique voltage dépendant (VDAC). Les travaux de l'équipe ont montré une compétition entre cycline D1 et l'hexokinase 2 (HK2) pour la liaison à VDAC, inhibant ainsi l'activité de celui et réduisant donc la production d'ADP, d'ATP et de métabolites et donc la production d'énergie.

Les travaux de l'équipe (122) ont montré que la cycline D1 est capable d'inhiber l'activité mitochondriale dans les cellules B. Lorsqu'elle se situe au niveau de la membrane extérieure mitochondriale, elle est capable de se lier à un canal anionique-voltage dépendant par son domaine central. Cycline D1 rentre ainsi en compétition avec l'hexokinase 2 dans la liaison à ce canal, diminuant la production d'ADP, d'ATP et de métabolites, réduisant ainsi la production d'énergie. Cette fonction de la cycline D1 a aussi été rapportée dans des cellules épithéliales mammaires, suggérant que ce mécanisme pourrait être ubiquitaire (123).

III. Rôles oncogéniques de cycline D1

Cycline D1 exprimée de façon aberrante, va jouer un rôle oncogénique. En effet, la t(11;14)(q13;q32) est un évènement précoce nécessaire mais non suffisant dans le développement du LCM. Lorsque cycline D1 est surexprimée, elle acquiert le statut d'oncogène. On la retrouve impliquée dans de nombreux cancers : hémopathies lymphoïdes (LCM, MM) cancers ORL, du poumon, de la vessie, de la prostate, de l'endomètre et du sein (124).

La surexpression de la cycline D1 peut être due à différents mécanismes :

- par réarrangement génique, le gène de *CCND1* se retrouve alors sous le contrôle d'un nouveau promoteur, celui de l'hormone parathyroïde dans le cas des adénomes parathyroïdiens ou celui de la chaine lourde des immunoglobulines dans les hémopathies lymphoïdes (cf. Figure 4, page 15) ;

- par amplification du locus *CCND1*. On retrouve ce mécanisme dans 15% des cancers du sein et il est généralement associé à un mauvais pronostic ;

- par mutation de la région 3'UTR, région importante pour la régulation physiologique de cycline D1. Des micro ARN de la famille miR-15/16 et miR17-92 ciblant directement cette région 3'UTR (105) ;

- par des mutations géniques qui touchent des régions de la protéine impliquées dans sa dégradation soit des mutations qui touchent le site d'épissage de l'intron 4, soit des mutations dans la partie C-terminale qui interfèrent avec la phosphorylation en Thr286 (125).

- par des mutations de la région 5'-UTR de *CCND1.* Une séquence de 15 pb située en 5'-UTR du gène forme une région appelée DIE (*cyclin D1 inhibitory element*). Lorsque cette région est mutée, le promoteur de *CCND1* est suractivé et la transcription n'est plus régulée (126).

1. Dérégulation du cycle cellulaire

Cycline D1 contrôlant le cycle cellulaire, lorsque celle-ci est exprimée de manière dérégulée, cela va provoquer le passage de la phase G1 à la phase S aboutissant à la division cellulaire pour des cellules qui n'y étaient pas programmées. En effet cycline D1 va avec l'aide de CDK4 phosphoryler ses cibles, tout d'abord RB1 provoquant ainsi la libération de E2F1, mais aussi Smad3, inhibant ainsi son activité bloquant le cycle en phase G1 et permettant donc la poursuite du cycle cellulaire (113).

2. Induction d'une instabilité génomique

La surexpression de cycline D1 provoque une instabilité génomique par différents mécanismes que nous allons détailler (Figure 21).

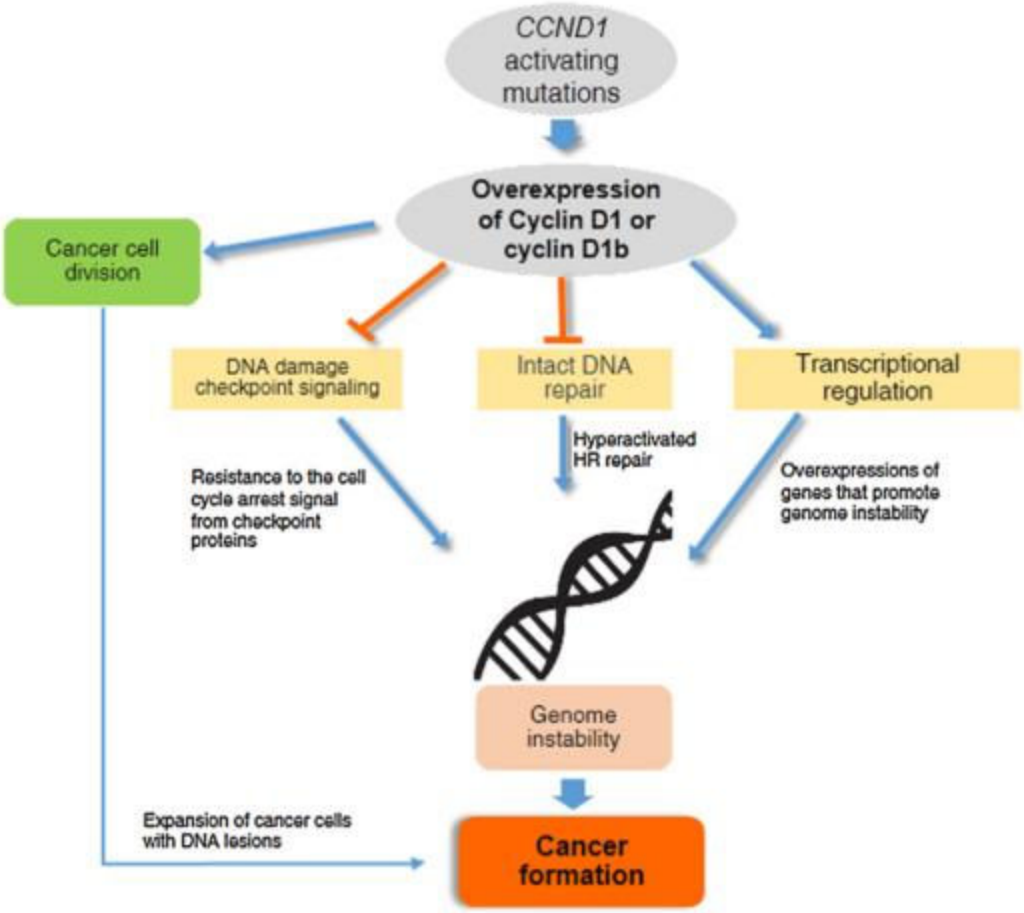


Figure 21 : La surexpression de cycline D1 influence l'intégrité du génome et la formation de tumeurs. La surexpression de cycline D1 antagonise les signaux d'arrêt du cycle cellulaire, hyperactive la réparation de type homologue et facilite la transcription de gènes qui interfère avec la stabilité du génome. L'ensemble de ces signaux provoquent une insatabilité génomique conduisant à la formation de cancer. D'après (116).

2.1. Inhibition d'une réparation de qualité

Cette instabilité génomique survient suite à l'introduction de cassures de l'ADN qui ne sont pas prises en charge par la cellule. Ces cassures de l'ADN non réparées provoquent soit des changements structuraux soit la mort cellulaire. Pour faciliter la réparation, le cycle cellulaire doit être stoppé par les voies de contrôle des dommages à l'ADN, notamment les protéines ATM, ATR et CHK1/2. Il a été montré que la dégradation de cycline D1 était le tout premier point de contrôle de ces voies et qu'elle était essentielle pour l'arrêt du cycle cellulaire après la survenue de dommages à l'ADN dans des lignées cellulaires de mélanome (127,128).

2.2. Rôle transcriptionnel

Casimiro *et al*. (129) ont montré que cycline D1 possédait un rôle transcriptionnel indépendant des CDK4/6 directement lié à l'instabilité chromosomique. Cycline D1 est capable de se lier à l'ADN et d'activer les promoteurs de différents gènes qui régulent la ségrégation chromosomique (séparation ordonnée des chromosomes pendant la mitose) et par ce biais l'intégrité génomique dans des cellules tumorales de cancer du sein. Ces gènes comprennent entre autre *AURKB, TOP2A, CENPP, CENPU, ZW10* et *CKAP2*.

2.3. Rôle direct de cycline D1 dans l'instabilité génomique

Comme cela a été dit précédemment, cycline D1 fait partie intégrante du complexe de réparation RAD51-BRCA2 qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN par RH. Dans la cellule tumorale, cycline D1 est constamment exprimée ; elle se lie donc à BRCA2 et recrute RAD51, même en l'absence de dommages à l'ADN. La RH est donc continuellement hyperactive provoquant par voie de conséquence une grande instabilité génomique par de nombreux réarrangements interchromosomaux et l'introduction d'erreurs par mésappariements. Enfin, l'expression continue de cycline D1 donne un avantage de survie aux cellules cancéreuses lors des traitements génotoxiques, en permettant à ces cellules de réparer plus facilement les lésions provoquées par ces molécules. La cycline D1 est donc pourvoyeuse de chimiorésistance dans les cancers du sein (Figure 22) (129,130).

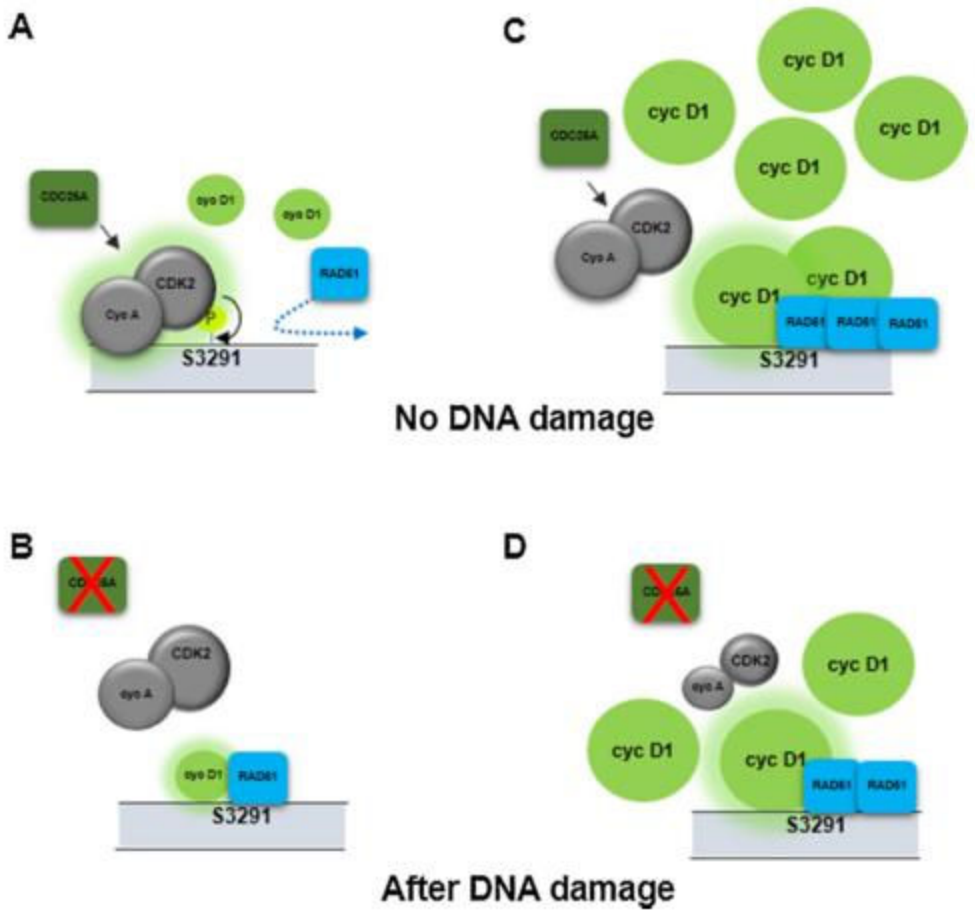


Figure 22. Régulation de la recombinaison homologue par cycline D1 et ses conséquences. A. Dans les cellules normales sans dommages à l'ADN, la RH est inhibée par la phosphorylation en position S3291 de BRCA2 par les complexes cycline A/B/CDK1/2. **B.** Après des dommages à l'ADN, CDC25A est inhibée provoquant une inactivation de cycline A/B/CDK1/2 et permettant ainsi l'expression de cycline D1. Cycline D1 se fixe sur BRCA2 et favorise le recrutement de RAD51 et permet la RH. **C.** Lorsque cycline D1 est surexprimée, elle se lie spontanément à BRCA2 et RAD51 est recrutée, cela hyperactive la RH et, par conséquent, l'instabilité génomique. **D.** La cellule cancéreuse, est en mesure de réparer de manière plus importante l'ensemble des lésions de l'ADN provoquée par les traitements, rendant ainsi la tumeur spontanément résistante. D'après (116).

3. Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus en plusieurs étapes qui permet aux cellules transformées d'infiltrer le stroma tumoral contribuant ainsi à l'invasion des cellules cancéreuses et à la formation des métastases.

Dans le cancer du sein triple-négatif (ne présentant pas de récepteurs pour l'œstrogène, la progestérone, ni pour HER2), l'induction de cycline D1 est requise pour la migration cellulaire contrôlée par le TGFβ. En effet, lorsque cycline D1 est éteinte, les cellules adoptent un phénotype épithélial, le TGFβ n'induit plus l'expression de vimentine et la colocalisation entre le TGFβ et la F-actine disparait de la membrane cellulaire. De plus, la formation d'invadopode disparait. Ce mécanisme de contrôle des phénomènes de migration et d'invasion, passe une coopération entre cycline D1 et $p21^{CIP1}$ qui sont colocalisées. Par ailleurs, $p27^{KIP1}$ est également requis dans certains des mécanismes de migration contrôlés par cycline D1. En effet la mutation K112 de cycline D1 (mutation au niveau de la *cyclin-box*, empêchant l'interaction avec CDK4/6) ou la délétion des résidus 46 à 90 de la partie NH2-terminale empêchent l'interaction physique entre cycline D1 et $p27^{KIP1}$ et sont responsables d'une perte du potentiel de migration des cellules épithéliales de cancer du sein. D'autre part, cycline D1 favorise la mobilité cellulaire en inhibant la transcription de *Rho activated kinase II* (*ROCK*) et du suppresseur de métastase *thrombospondin 1* (*TSP-1*) (131–133).

4. Contrôle de la stabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est décrite comme étant une perte ou un gain de chromosome et/ou la survenue d'aberrations structurelles persistantes (translocations, délétions, inclusions) qui entrainent un caryotype anomal. L'instabilité chromosomique intervient relativement précocement durant le processus de transformation. Elle est associée à un moins bon pronostic et est considérée comme un marqueur du cancer (134). Il a été montré dans des hépatocytes murins, que la surexpression de cycline D1 induisait une amplification des centrosomes, et donc la présence de fuseaux mitotiques multipolaires provoquant ainsi une aneuploïdie (135). L'aneuploïdie est impliquée dans les processus transformants car la perte d'hétérozygotie peut survenir sur des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou sur le gain d'oncogènes. D'autres données montrent que cycline D1 se lie à des gènes régulant la stabilité

chromosomique. La quantité de cycline D1 détermine le recrutement de protéines de remodelage la chromatine telles que p300/CBP, SUV39H1, HIP1α and HDAC1/3 et contrôle ainsi localement, l'acétylation et la déméthylation des histones. L'étude de 2254 patients a également montré que le niveau d'expression de cycline D1 est corrélé avec l'induction d'une instabilité chromosomique dans le cancer du sein luminal B (129). Il a également été montré par Alan Diehl *et al.* (136), qu'un échec dans la dégradation de D1 bloque le cycle en phase S provoquant de l'instabilité génomique après un stress génotoxique. La dégradation de cycline D1 est donc un mécanisme nécessaire pour prévenir la survenue d'instabilité génomique post-stress génotoxique.

5. Régulation de l'apoptose mitochondriale

L'équipe a montré que cycline D1 régulait la voie d'apoptose mitochondriale *via* un effet de HSP70 (*heat-shock protein* 70) sur les effecteurs apoptotiques pré- et post-mitochondriaux (137). Le canal VDAC sert de point d'ancrage pour les protéines de la famille BCL2. Le canal sert aussi à la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Le relargage mitochondrial de molécules pro-apoptotique est un point clé des voies de signalisation de la mort cellulaire. La fermeture de VDAC par cycline D1 pourrait ainsi prévenir la survenue de l'apoptose en bloquant ces mécanismes (122).

6. Inhibition de l'autophagie

L'autophagie est activée après des dommages à l'ADN et par d'autres stress dans le but de réduire les dommages cellulaires. Elle permet la dégradation des protéines, des lipides et des organelles endommagées. La cellule utilise ses propres lysosomes pour détruire à grande échelle les macromolécules et les organites (138). L'autophagie est contrôlée par la kinase AMPK. Il a été montré que cycline D1 module l'activation de l'AMPK et inhibe donc ainsi l'autophagie. L'autophagie limite l'instabilité génomique. L'inhibition de cette dernière par cycline D1 est cohérente avec l'induction d'une instabilité chromosomique par cycline D1. C'est donc un rôle supplémentaire de cycline D1 en tant qu'oncogène (139).

7. Inhibition de l'anoïkis

L'adhérence à une matrice extracellulaire appropriée est critique pour la survie des cellules normales, en effet un détachement de ce support provoque un type spécifique d'apoptose appelé l'anoïkis. L'anoïkis est régulée par les facteurs de transcription de type FOXO : FOXO1 et FOXOA3. Il a été montré que cycline D1 interagit avec FOXO et entrave leur régulation transcriptionnelle et ainsi leur fonction pro-anoïkis. Cet effet de cycline D1 requiert son domaine de répression RD (142 à 253 aa) mais est indépendant de CDK4/6. La perte de ce phénomène d'anoïkis provoque des métastases cancéreuses puisque celles-ci sont en mesure de survivre hors de leur microenvironnement initial (140).

IV. Rôles oncogéniques de cycline D1 dans le LCM

Parmi les multiples rôles décrits de cycline D1, seuls quelques uns ont été décrits comme participant à la physiopathologie du LCM, d'autres rôles restent à ce jour à affirmer ou à infirmer.

1. Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération

L'évènement oncogénique initial du LCM est la t(11;14)(q13;q32), et cycline D1 est surexprimée très précocement dans les LB. La surexpression anormale de cycline D1 n'est pas suffisante à elle seule pour induire le phénotype cancéreux, mais elle favorise, par ses effets sur le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération des LB pré-cancereux, augmentant ainsi drastiquement le risque d'acquisition d'altérations génomiques supplémentaires et donc la transformation des LB en cellules cancéreuses. Parmi les altérations génomiques supplémentaires, ont été décrites des mutations/délétions touchant des régulateurs du cycle cellulaire *INK4a* et *CDK4*, des gènes de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN comme *ATM*, *TP53* et *ARF* ainsi que des composants des voies d'apoptose comme *BCL2L11* et *BCL2* (16).

Les travaux de l'équipe ont mis en évidence un rôle direct de cycline D1 dans le contrôle de la prolifération. En effet l'extinction de cycline D1 diminue les capacités de prolifération *in*

vitro de la lignée de LCM JeKo-1 par inhibition de la transition G1-S du cycle cellulaire. Cependant, il apparait que le ciblage de cycline D1 seul ne soit pas une cible thérapeutique prometteuse, en effet dans les cellules de LCM, on observe un effet compensatoire par cycline D2 lors de l'extinction de cycline D1 (141).

2. Séquestration de BAX et contrôle de l'apoptose

Cycline D1 séquestre dans le cytoplasme la protéine pro-apoptotique BAX, la rendant ainsi physiologiquement inactive. Cela favorise les fonctions anti-apototiques de BCL2 qui n'est plus inhibée par BAX. En effet, l'inhibition seule de cycline D1 dans un modèle murin de LCM n'est pas suffisant pour faire régresser la tumeur, en revanche cette inhibition sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose stimulée par l'ABT-737, un inhibiteur de BCL2 (142).

D'autre part, il a été montré que cycline D1 s'associe à $p27^{KIP1}$ permettant une inhibition de l'apoptose et une prolifération augmentée. Cette association a été mise en évidence grâce à l'analyse du mécanisme d'action du lénalidomide qui agit en dissociant ces complexes dans le LCM (143).

Objectifs de mon projet de thèse

De très nombreux progrès ont été réalisés dans la prise en charge du LCM depuis ces dernières années avec une évolution de la prise en charge des patients et des gains en terme de survie (56). Malgré ces avancées la pathologie demeure aujourd'hui incurable avec de nombreuses rechutes. Il est nécessaire de poursuivre les efforts en terme de recherche scientifique afin d'améliorer le traitement des patients. Additionnellement aux essais cliniques sur les nouvelles combinaisons thérapeutique et sur l'extension au LCM de médicaments ayant obtenu l'AMM pour d'autres pathologies, les efforts doivent aussi se concentrer sur l'amélioration des connaissances de la physiopathologie de la maladie. L'amélioration de ces connaissances pourrait permettre, à terme de trouver d'une part, de nouvelles cibles thérapeutiques et potentiellement de nouveaux agents, diversifiant ainsi l'offre thérapeutique et d'autre part d'affiner la stratification des patients selon des scores pronostiques qui devraient permettre de hiérarchiser les traitements afin que chaque patient bénéficie du meilleur rapport efficacité thérapeutique/morbidité. La diversification de l'offre thérapeutique aidant dans cette hiérarchisation. Un autre point important est la compréhension des mécanismes de résistances aux anticancéreux et les moyens de limiter leur apparition et éventuellement de contourner leur survenue.

Dans mon travail de thèse, nous nous sommes attachés à améliorer les modèles pré-cliniques *in vivo* existants afin de pouvoir évaluer de manière performante l'effet de nouveaux traitements sur les cellules cancéreuses. Nous avons mis en place un modèle de xénogreffe utilisant des lignées cellulaires modifiées afin d'exprimer un fluorophore (GFP ou *mcherry*) ainsi que le gène de la luciférase. Nous avons injecté ces cellules par voie i.v. dans des souris immunodéprimées et avons suivi la domiciliation tumorale de manière hebdomadaire grâce à l'expression de photons de luminescence émis suite à l'injection du substrat de la luciférase : la luciférine.

Grâce à ces modèles, nous avons pu évaluer l'efficacité de différentes molécules. Tout d'abord nous nous sommes intéressés à l'effet d'agonistes aux récepteurs de sous-type β de

l'œstrogène. Ce sous-type de récepteur est exprimé au niveau des lymphocytes B et possède une activité pro-apoptotique et anti-proliférative.

Ensuite nous avons testé *in vivo* l'efficacité d'un inhibiteur de l'exportine 1 : le KPT-330 qui a pour effet de bloquer l'export cytoplasmique de nombreuses molécules incluant la cycline D1. Nous avons montré que la cycline D1, lorsqu'elle est cytoplasmique, favorise des phénomènes d'invasion et de migration.

Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes de résistance au stress génotoxique *in vitro* de lignées de LCM. La résistance au stress génotoxique est le principal mécanisme de chimiorésistance des tumeurs, et provoque les rechutes des patients. Nous avons identifié différents comportements des lignées de LCM. Une lignée, particulièrement résistante présente notamment une activité diminuée du protéasome 26S.

Enfin, afin d'améliorer nos connaissances sur la physiopathologie du LCM, et puisque les rôles de la cycline D1 dans la pathogenèse est intimement lié aux partenaires qui lui sont associés, nous avons cherché à découvrir de nouveaux partenaires grâce à une technique d'immunoprécipitation couplée à de la spectrométrie de masse. La protéine FUS est apparue être un nouveau candidat prometteur, nous nous sommes donc intéressés aux interactions entre la cycline D1 et la protéine FUS, notamment dans la réponse aux dommages à l'ADN, là où l'on sait où elle agit déjà.

Résultats

A. Mise en place d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* pour le LCM

Nous avons mis en place un nouveau modèle *in vivo* qui permet de suivre au cours du temps la croissance tumorale et qui permet aux cellules tumorales d'interagir avec leur micro-environnement. Pour ce faire, nous avons modifié génétiquement de manière stable, à l'aide de rétrovirus ou de lentivirus des lignées de LCM afin de leur faire exprimer le gène de la luciférase. Lorsque la luciférine, substrat de la luciférase, est injectée i.p. aux animaux, une réaction enzymatique d'oxydation va s'effectuer et va aboutir à la production d'oxyluciférine ainsi que de photons de luminescence. Ces photons sont suffisamment pénétrants pour pouvoir être détectés par un bioluminomètre à travers le corps de l'animal, nous permettant ainsi de suivre la domiciliation et la croissance tumorale régulièrement. La mise en place de ce modèle respecte la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) nécessaire à l'approbation du projet en comité d'éthique. Nous remplaçons les modèles existants vers un modèle que nous espérons plus performant. Nous raffinons la méthodologie en proposant une méthode d'exploration non invasive, ne nécessitant pas la mise à mort des souris pour une analyse cinétique, nous permettant ainsi de réduire également le nombre d'animaux.

Les matériels et méthodes nous ayant permis l'obtention du modèle vous sont présentés maintenant.

Les lignées de LCM utilisées durant ma thèse ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) et 100 U/ml de pénicilline et de streptomycine. Ces cellules poussent en suspension, elles sont cultivées à 37°C sous 5% de CO_2 dans un incubateur en atmosphère humide. Les lignées utilisées vous ont été présentées précédemment (page 34).

I. Protocoles

1. Transduction des lignées Granta519 et Z138 par des rétrovirus afin d'obtenir des cellules GFP-Luc

1.1. Production des particules rétrovirales

Les rétrovirus portant les gènes d'intérêt ont été produits par transfection du plasmide pMSCV-Luc2-PGK-Neo-IRES-GFP (LPNIG) (Figure 23) dans les cellules Phoenix™ en utilisant le kit CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., CA, USA). Les cellules Phoenix™ dérivent de la lignée cellulaire HEK-293T, lignée de cellules rénales embryonnaires transformées par l'adénovirus E1a et portant un antigène T de SV40 sensible à la température et co-sélectionné avec de la néomycine (144).

Les cellules Phoenix™ ont été cultivées afin d'obtenir une confluence de 50 à 80% soit une densité cellulaire de 2 à 4 x 10^5 cellules par puits de 3 cm de diamètre dans un volume final de 3 ml. Le plasmide LPNIG précipité à l'aide d'une solution de phosphate de calcium 2 M en tampon HEPES (100 µl) a été mis en contact avec les cellules. Le surnageant contenant les particules virales a été récolté 48 h après la transfection.

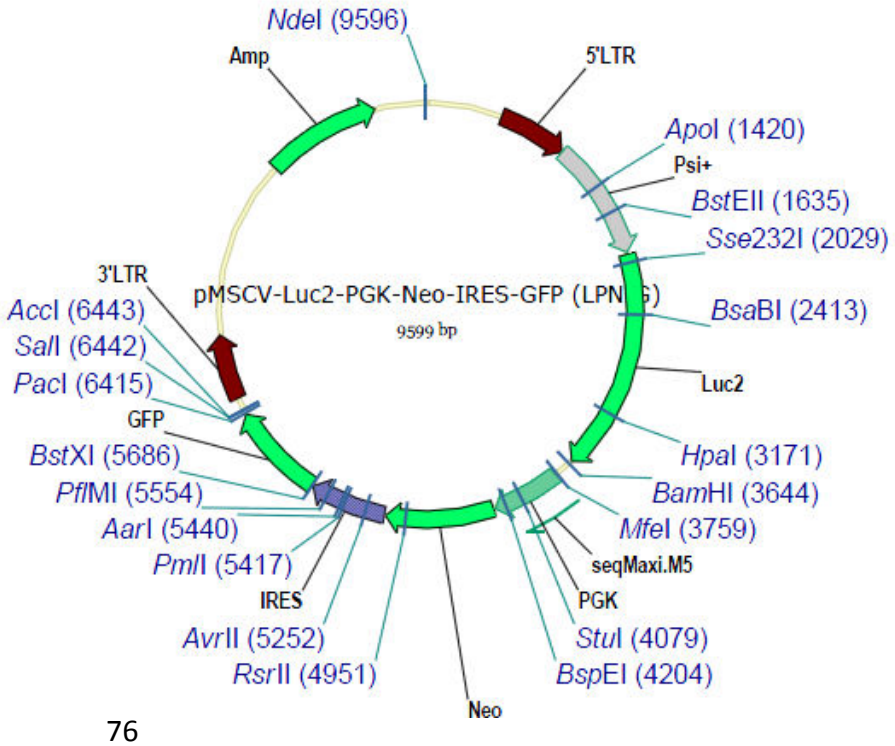


Figure 23. Carte du plasmide pMSCV-Luc2-PGK-Neo-IRES-GFP (LPNIG). Ce plasmide exprime à la fois le gène *Luc2 (2018-3644)* codant pour la luciférase ainsi que le gène *GFP (5686-6415)* codant la *green fluorescent protein* (GFP), le gène *Neo* (4224-5058) de résistance à la néomycine et un gène *Amp* de résistance à l'ampicilline.

1.2. Transduction des cellules

Le surnageant contenant les particules virales a été filtré (0,45 µm) puis les particules virales concentrées par centrifugation à 20 200 g, à 12°C pendant 2 h (WX Ultra Series Centrifuge, Thermo Scientific). Le culot a été remis en suspension par agitation dans 50 µL de PBS pendant 1 h minimum à 4°C. Afin d'augmenter l'efficacité de transduction des cellules, une étape supplémentaire de centrifugation à 1 200 g, à 32°C durant 1 h 30 (Megafuge 16R, Thermo Scientific) a été ajoutée, permettant ainsi un meilleur contact entre les virus et les cellules Granta519 et Z138. Les cellules transduites ont été observées au microscopie (DFC295, Leica) à partir de 48 h post-transduction pour détecter la fluorescence de la GFP.

1.3. Tri des cellules

Les cellules Granta519 et Z138 ont été triées par CMF (BD FACSAria TM II. BD Biosciences) en fonction du niveau d'expression de la GFP. Les cellules ont été lavées et mises en suspension à la concentration de 2.10^6 cellules/ml dans le tampon de triage (PBS contenant 1 mM EDTA ; 25 mM HEPES pH 7,0 ; 1% FBS). Les cellules triées ont été remises en culture à la concentration de 5.10^5 cellules par ml en milieu complet pour être amplifiées.

2. Autres lignées cellulaires de MCL modifiées et utilisées dans nos expériences

D'autres lignées cellulaires de LCM ont été produites dans le cadre de cette collaboration et nous avons pu utiliser *in vivo* les lignées Granta519-GFP, Jeko1-mCherry-Luc, REC1-GFP-Luc et Z138-Luc.

La lignée REC1-GFP-Luc a été générée en utilisant des particules lentivirales, produites par des cellules 293T placées à la concentration de 3.10^6 cellules dans des plaques de culture de 10 cm de diamètre. Ces cellules ont été transfectées par 0,75 µg de *vesicular stomatitis virus glycoprotein* (VSV-G) ; 1,5 µg de plasmide *gal pol expresser* (p8.91) et 2.25 µg de plasmide pSIN-DUAL-Luc-GFP2 (145) en utilisant de la Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. Le milieu de culture a été changé 12 h après la transfection et le surnageant viral recueilli 48 h après celle-ci a été filtré sur un filtre de 0.45 µm (Millex® Milllipore). Les cellules

REC1 (2.10^5) ont été placées dans des plaques de culture 24 puits et incubées avec les particules lentivirales. Les cellules transduites ont été triées en fonction de l'expression de GFP en utilisant un trieur FACSAria. L'activité de la luciférase a été mesurée à l'aide du système de dosage Luciferase (Promega).

La lignée JeKo1-mcherry-Luc a également été générée en utilisant des particules lentivirales. Les cellules 293T ont été transfectées par les constructions FUW-Luc-mCherry-puro, VSV-G et psPAX2 en utilisant la Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen). Le surnageant a été récolté 24 et 48 h après la transfection et filtré (0.45 µm). Les cellules JeKo1 (5.10^6 cellules) ont été transduites en utilisant 50 µl de particules virales ainsi que 8 µg/ml de polybrène (Sigma-Aldrich) et 10 nM d'HEPES (Gibco) comme décrit précedemment (65). Les cellules transduites ont été sélectionnées dans 1 µg/ml de puromycine (Sigma-Aldrich).

La lignée Z138-Luc a été générée de manière analogue a ce qui a été décrit précédemment.

Nous avons précédemment montré que l'émission de photons de luminescence de la lignée de myélome multiple 8226-GFP-Luc (voir annexe 3) est proportionnelle au nombre de cellules ensemencées *in vitro* (Figure 24).

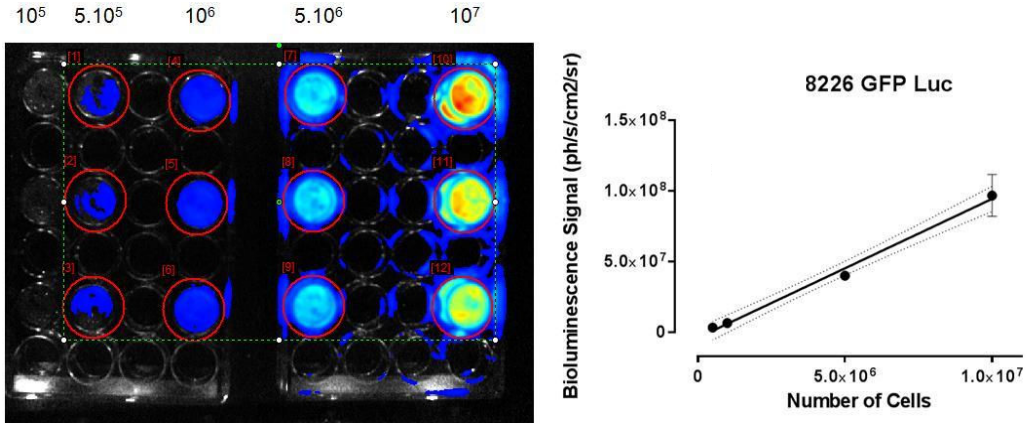


Figure 24 : Corrélation entre le nombre de cellules de la lignée 8226-GFP-Luc. La bioluminescence des cellules 8226-GFP-Luc en culture est évaluée en utilisant 125 µg de D-Luciférine par puit (volume final de 1 ml). L'acquisition de 2 min a été précédée d'une incubation de 5 min à température ambiante. La droite de corrélation a été tracée grâce à une régression linéaire effectuée sur le logiciel Prism $y = 9.8x$-$3{,}6.10^6$ et $R^2 = 0.9673$..

II. Xénogreffe des lignées de LCM exprimant GFP-Luc dans des souris immunodéprimées.

1. Injections des lignées de LCM

Les expériences *in vivo* ont été conduites en accord avec les recommandations de la Communauté Européenne (86/609/CEE). Elles ont été approuvées par le comité d'éthique en expérimentation animale de notre département (agrément CENOMEXA : N109-11-12/32/11-15 en France et agrément UB-CEEA : 251/15 en Espagne). Les lignées Granta519-GFP, JeKo1-mCherry-Luc, Rec1-GFP-Luc et Z138-GFP-Luc ont été implantées dans des souris mâles SCID (n= 5 ou 7 par groupe) ou NSG (n= 6 par groupe), toutes âgées de 5 à 6 semaines. Les cellules ont été injectées dans la veine caudale des souris à la concentration de 10^5 cellules/µl, soit 10^7 cellules dans un volume final de 100 µl de sérum physiologique en utilisant des seringues à insuline 29G x 12 mm (Myjector®, Terumo). L'injection a été faite sur des souris vigiles maintenues en contention. Les souris ont été placées en légère hyperthermie 10 min avant l'injection afin de provoquer une vasodilation caudale.

2. Suivi de la croissance tumorale

La prise de greffe ainsi que la croissance tumorale ont été déterminées de manière hebdomadaire par imagerie de bioluminescence (BLI). Les souris ont été injectées i.p. par 75mg/kg de D-Luciférine (Promega) et analysées par un PhotonIMAGER™ (Biospace lab) en France et par un bioluminomètre IVIS® Lumina S5 (Perkin Elmer) en Espagne. Les photons produits par la réaction enzymatique ont été captés sur l'intégralité du corps des souris, ventralement et dorsalement pendant une période de 5 minutes. Durant l'acquisition, les souris ont été maintenues sous sédation par une anesthésie gazeuse continue de 1.5% d'isoflurane (Piramal Critical Care, USA) dans 30% de dioxygène (O_2) et 70% de protoxyde d'azote (N_2O) après une phase d'induction de l'anesthésie par 2% d'isoflurane pendant 5 min. Durant l'acquisition de la luminescence, les souris ont été maintenues à la température de 37°C à l'aide d'un plateau thermostaté.

3. Mise à mort des animaux

A la fin de l'expérience, les souris ont été, selon le terme consacré, mises à mort par dislocation cervicale dans le respect des bonnes pratiques éthiques. L'opération a été effectuée sous anesthésie/analgésie à 5% d'isoflurane dans un mélange 30% O_2/70% N_2O, après une phase d'induction à la même concentration pendant 5 min. Un volume de 200 µl de sang a été prélevé par ponction intracardiaque pour chaque souris et a été conservé dans la glace dans un tube Eppendorf® contenant 100 µl de PBS et 5% EDTA 0,5 M pH8,0. Les souris ont ensuite été disséquées afin d'isoler différentes pièces anatomiques d'intérêt : fémurs et tibias des membres postérieurs, rate et éventuellement cerveau en cas de signal de bioluminescence dans celui-ci. Ces organes ont été placés dans du milieu de culture RPMI 1640, dans la glace jusqu'à dissociation.

4. Analyse des organes infiltrés

Les organes infiltrés par des cellules exprimant la luciférase ont été exploités avec un triple objectif. Nous voulions obtenir : des échantillons cryoconservés à -80°C afin de pouvoir effectuer des extractions d'ADN et d'ARN si besoin ; des échantillons fixés en paraformaldéhyde (PFA) afin de réaliser des marquages immuno-histologiques ; et enfin, des cellules isolées afin de les marquer et de les analyser en CMF.

Les rates ont été pesées et mesurées pour chaque souris, puis elles ont été divisées en 3 parties égales. Un premier tiers de rate, le fémur gauche ainsi que l'hémisphère cérébral gauche ont été fixés en paraformaldehyde 4% en PBS pH7,4.

Les deux tibias et un deuxième tiers de la rate ont été placés respectivement dans une cupule de cryoconservation dans du gel OCT (Cryomold, milieu OCT, Sakura) et stockés à -80°C.

La moelle osseuse du fémur droit a été aspirée puis les cellules ont été dissociées mécaniquement dans du milieu RPMI 1640. Cette opération a également été réalisée pour le dernier tiers de la rate ainsi que pour l'hémisphère droit du cerveau. Les cellules ont ensuite été passées à travers un tamis cellulaire de 40 µm (Cell Strainer 40 µm, Corning) puis les globules rouges ont été hémolysés à l'aide d'un tampon (ACK Lysing Buffer, Gibco). Les cellules cérébrales ont subi une étape supplémentaire de démyélinisation par des billes magnétiques (Myelin Removal Beads, Miltenyi Biotech.). Les cellules ont été marquées par les

anticorps suivants : Iotest®(Beckman) anti-CD20-PE ou anti-CD19-PE (phycoérythrine, IM1451, FL2) et Miltenyi® anti-CD45-Vioblue® (clone 5B1, Miltenyi Biotech., FL9), ainsi qu'avec les anticorps isotypiques correspondant en contrôle. Les cellules ont été analysées sans fixation en CMF (Gallios, Beckman Coulter).

III. Evaluation du modèle

1. Efficacité de production des lignées GFP-Luc

L'établissement des lignées de LCM exprimant la luciférase a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Gaël Roué de *l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS), Barcelone, Espagne. J'ai travaillé, à Barcelone, pendant 2 mois, sur la production des lignées Granta-GFP-Luc et Z138-GFP-Luc. Après les différentes étapes de production des particules rétrovirales par transfection, puis de transduction des lignées d'intérêts avec les virus, nous avons obtenu des cultures hétérogènes de cellules exprimant ou pas la GFP. Afin de sélectionner uniquement les cellules transduites, les échantillons ont été triés par CMF. Nous avons sélectionné les cellules dont la fluorescence était un log supérieur à celle de l'auto-fluorescence des cellules non transduites. Nous avons ainsi récupéré 1.4% de cellules Granta519 et 0.4% de cellules Z138 exprimant GFP (Figure 25). Cette proportion de cellules efficacement transduites GFP+ est bien inférieure à l'efficacité habituelle des vecteurs rétroviraux (146). Elle peut être expliquée par la difficulté connue de transduire des cellules en suspension (147). La difficulté principale est de réussir ensuite à amplifier les cellules triées. Nous avons mis en culture ce faible nombre de cellules issues du tri cellulaires dans un petit volume de milieu de culture (100 µl dans une plaque 96 puits). Nous avons ensuite augmenté très progressivement le volume de milieu de culture afin de conserver une bonne densité cellulaire nécessaire à la viabilité des cellules.

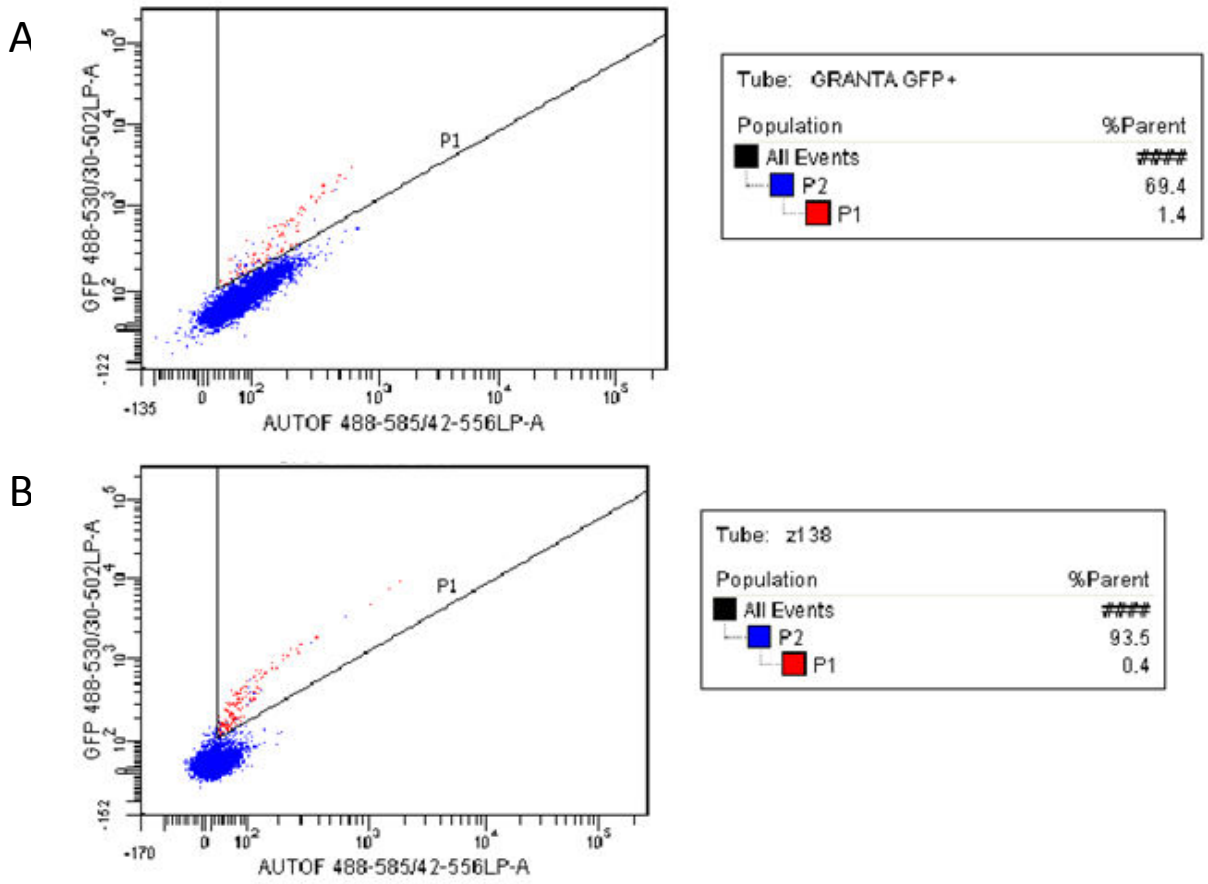


Figure 25 : Tri cellulaire des lignées de LCM transduites par les constructions rétrovirales. A. Les cellules Granta519-GFP-Luc transduites ont été triées afin de ne conserver que les cellules exprimant le plus la GFP Seules les cellules dans la fenêtre P1 ont été retenues, ce qui correspond à 1.4 % des cellules, **B.** Les cellules Z138 GFP-Luc transduites ont été triées afin de ne conserver que les cellules exprimant le plus la GFP. Seules les cellules dans la fenêtre P1 ont été retenues, ce qui correspond à 0.4 % des cellules.

Nous avons essayé, sans succès cependant, d'améliorer l'efficacité de transfection en utilisant du polybrène (4 µg/ml) au moment de la transfection. Nous avons également essayé de sélectionner les cellules transduites par le plasmide LPNIG qui porte le gène Neo^R en les traitant avec de la néomycine (1 mg/ml). Mais dans ces deux cas, la mortalité cellulaire globale était trop importante pour que les cellules transfectées puissent survivre.

Cependant, nous avons pu utiliser les lignées Granta519-GFP, REC1-GFP-Luc, JeKo1-mCherry-Luc et Z138-Luc obtenues dans le cadre d'une collaboration.

2. Suivi des animaux

Nous avons injecté parallèlement les cellules tumorales dans deux souches différentes de souris : SCID et NSG. Nous avons suivi de manière hebdomadaire la localisation des cellules tumorales par bioluminescence. Il est a noter qu'il est parfois possible d'observer quelques jours après l'injection un signal de luminescence proche du site d'injection objectivant une stase des cellules cancéreuses probablement due aux lésions tissulaires provoquées par l'injection. Ce signal de luminescence qui peut être parfois visible quelques jours après l'injection, a systématiquement disparu lors de la deuxième acquisition (Figure 26A). Ces observations sont évocatrices soit d'une mort des cellules tumorales en absence d'un microenvironnement protecteur et/ou de la migration des cellules tumorales dans des localisations plus favorables, soulignant ainsi l'importance de ce microenvironnement.

Le bien-être des souris a été évalué quotidiennement par l'animalier et de manière bi-hebdomadaire par l'expérimentateur. Les souris ont ainsi été pesées 2 fois par semaine afin de monitorer toute perte de poids supérieur à 10 % du poids initial ce qui signifierait l'atteinte d'un point limite synonyme d'arrêt du protocole pour la souris concernée (Figure 26B).

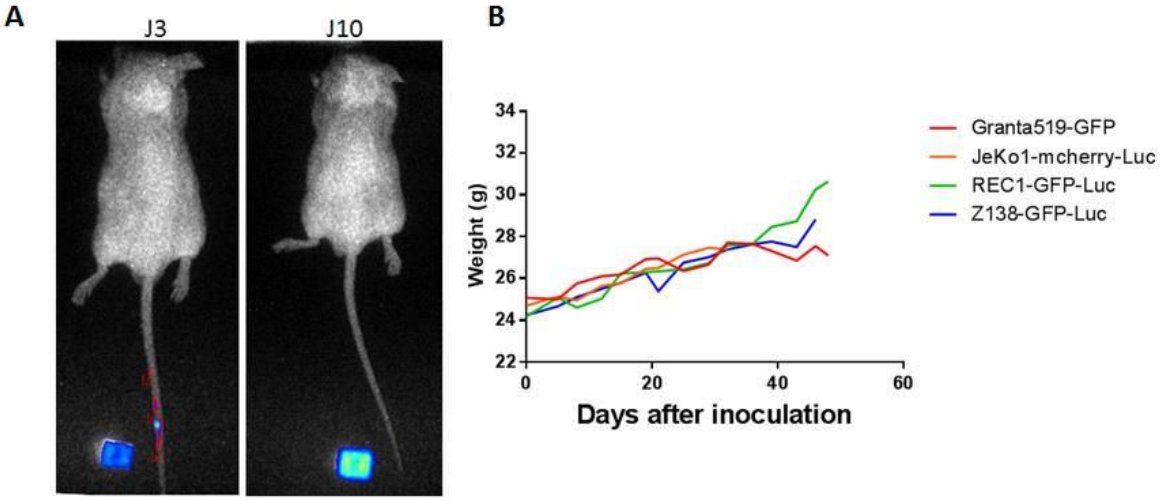


Figure 26 : Suivi des animaux durant le protocole : A. Le signal de bioluminescence observé dans la queue de souris inoculées avec la lignée JeKo1-mcherry-Luc a disparu entre la première et la deuxième acquisition (J3 *vs.* J10). **B.** Evolution de la moyenne du poids des souris aux cours de l'expérimentation. Le poids des animaux (7 souris par lignées) a été surveillé de manière bi-hebdomadaire.

3. Suivi de la xénogreffe

Le suivi hebdomadaire de la localisation des cellules tumorales par bioluminescence nous a nous permis ainsi d'observer la domiciliation des cellules tumorales principalement au niveau de la moelle osseuse des membres et dans le cerveau (Figure 27).

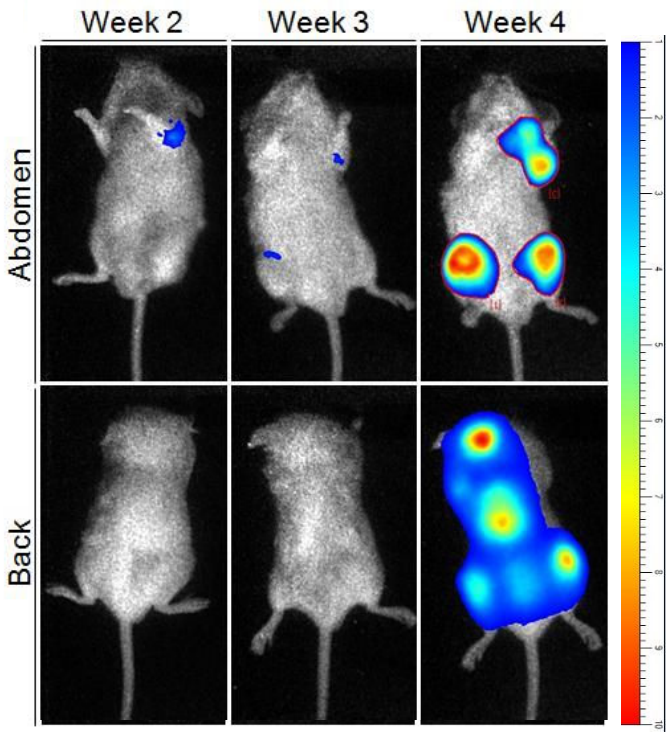


Figure 27 : Exemple de localisation des cellules tumorales JeKo1-mCherry-Luc dans une souris SCID : Après injection de 75 mg/kg de luciférine, les photons de luminescence émis par les cellules JeKo1-mCherry-Luc ont été captés par un Bioimager™. L'intensité des photons de luminescence est propotionnelle au nombre de cellules tumorales et peut être comparé d'une semaine à l'autre. Les masses tumorales se sont principalement développées au niveau de la moelle osseuse des membres et au niveau du cerveau. L'échelle latérale représente le nombre de photons par seconde ($x10^2$).

Les données de bioluminescence nous permettent de visualiser la localisation tumorale ainsi que de comparer semaine par semaine de manière quantitative, la croissance tumorale. Nous sommes en effet capables de mesurer le nombres de photons émis par minute, par stéradian et par centimètre carré ($min/sr/cm^2$). Nous avons ainsi pu récolter les données de

bioluminescence pour les lignées JeKo1-mcherry-Luc, Rec-GFP-Luc et Z138-Luc injectées dans les souches NSG et SCID.

En ce qui concerne la souche NSG, chaque lignée cellulaire a été injectée dans 6 souris mâles âgées de 5 à 6 semaines. La lignée JeKo1-mCherry-Luc a présenté un signal de bioluminescence dès la première acquisition J8 après l'injection des cellules dans les animaux, les souris ont été sacrifiées à J22. Les tumeurs étaient principalement localisées au niveau des membres. Des atteintes dorsale, possiblement au niveau du rachis ont également été observées. Pour la lignée Z138-Luc, le premier signal de bioluminescence a été détecté à J15 lors la deuxième acquisition dans les 6 souris du groupe. La localisation tumorale est similaire à celle observée pour la lignée JeKo1. Pour la lignée Rec1, le premier signal est apparu plus tardivement lors de la 4ème acquisition à J29 et ce, dans les 6 souris du groupe. La localisation tumorale est similaire au deux premières, avec cependant des atteintes au niveau du rachis moins prononcées (Figure 28).

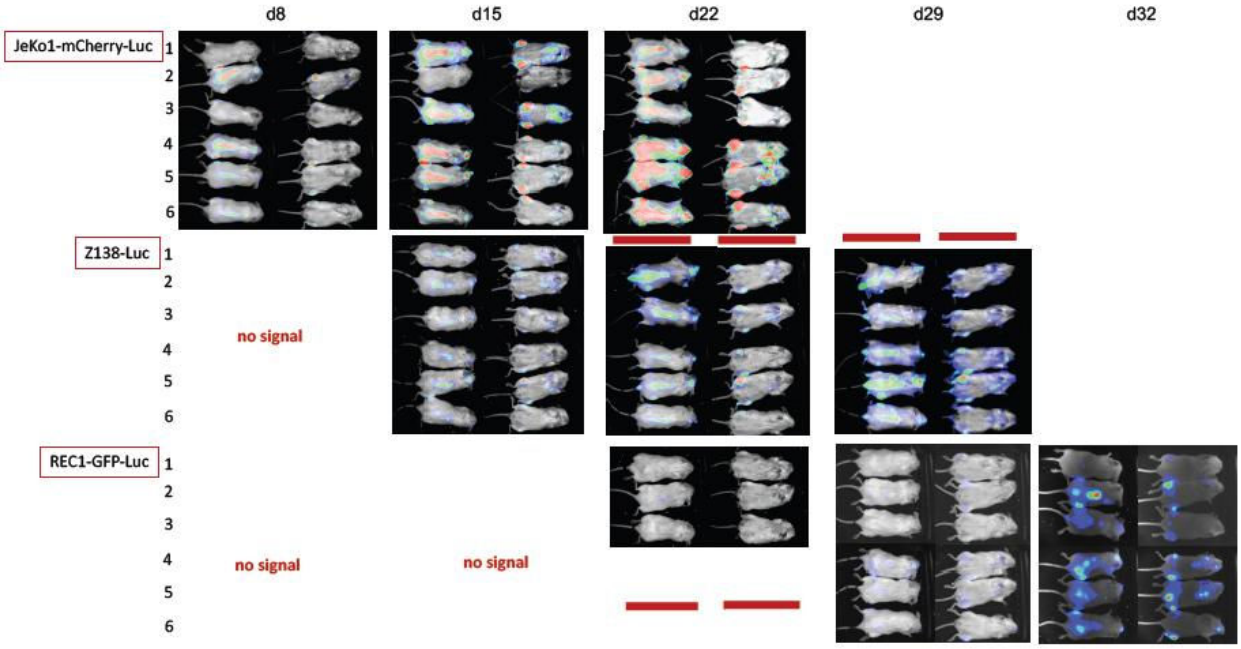


Figure 28 : Cinétique d'évolution du signal de bioluminescence des lignées JeKo-mcherry-Luc, Z138-Luc et Rec-GFP-Luc injectées dans des souris NSG. La luminescence émise par les cellules tumorales xénogreffées exprimant la luciférase, est observée après administration du substrat de l'enzyme, la luciférine en i.p. à la dose de 75 mg/kg. Après 5 min d'incubation, les souris NSG sont

placées sous anesthésie gazeuse dans un Bioimager™, afin de mesurer le nombre de photons de luminescence pendant 5 min dorsalement puis ventralement.

Pour la souche SCID, 7 souris par lignées ont été injectées. Dans cette série, l'apparition des premiers foyers de luminescence et la croissance des cellules tumorales n'est pas aussi homogène que dans la série précédente (Figure 16). Les premiers foyers luminescents correspondant à la lignée JeKo1-mCherry-Luc ont été détectés dans 2 souris (J6, J7) à la deuxième acquisition soit J14 après la xénogreffe. Les souris J4 et J6 sont mortes pendant l'expérimentation durant la phase d'anesthésie. Les souris J1, J2, J3 et J5 ont été euthanasiées J38 après l'injection, la souris J7 qui présentait des foyers luminescents plus intenses 5 jours avant. Les cellules tumorales sont localisées dans la moelle osseuse des membres postérieurs et antérieurs et pour certaines souris dans le cerveau (J1, J2, J4 et J7, Figure 29).

Figure 29 : Cinétique d'évolution du signal de bioluminescence sur la lignée de LCM JeKo-mCherry-Luc dans des souris SCID : La luminescence émise par les cellules JeKo-mCherry-Luc, est observée après administration du substrat de l'enzyme, la luciférine en i.p. à la dose de 75 mg/kg. Après 5 min d'incubation, les souris SCID sont placées sous anesthésie gazeuse dans un Bioimager™, afin de mesurer le nombre de photons de luminescence pendant 5 min dorsalement puis ventralement.

Le premier signal de bioluminescence pour la lignée Rec1-GFP-Luc a été observé pour 2 souris à J2. La souris R2 est morte pendant l'expérimentation sous anesthésie, sans présenter cependant de foyers luminescents détectables. Dans ce groupe de souris, les foyers de luminescence sont localisés comme ceux observés dans le groupe des souris JeKo1-mCherry-Luc, soit dans les membres, le rachis et le cerveau pour la souris R3 (Figure 30). Les souris ont été euthanasiées à J55 sauf la souris R4 euthanasiée à J38.

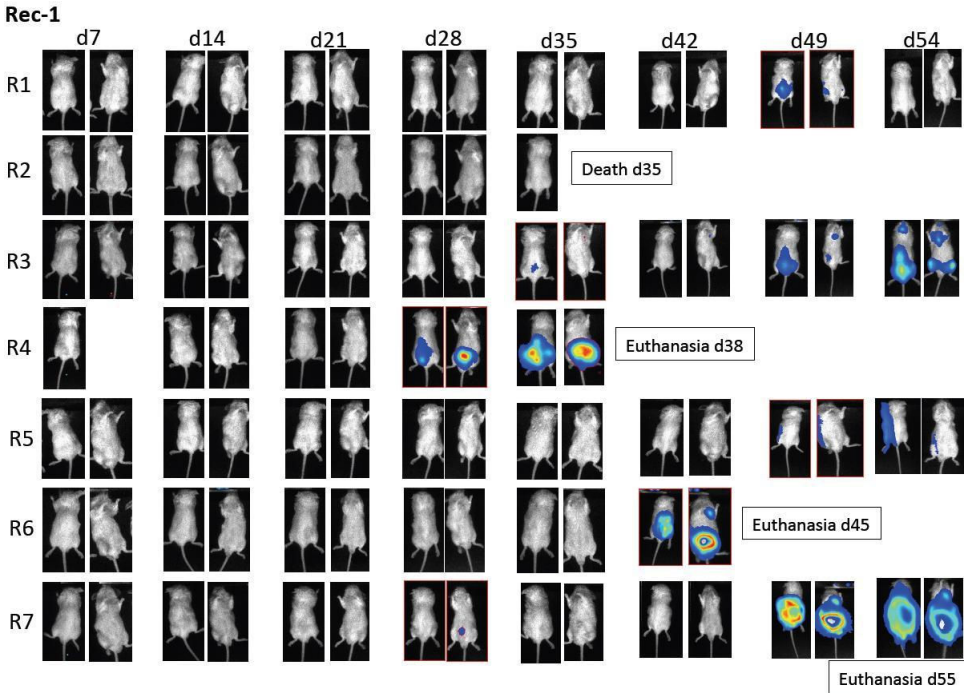


Figure 30 : Cinétique d'évolution du signal de bioluminescence sur la lignée de LCM Rec-GFP-Luc dans des souris SCID : La luminescence émise par les cellules Rec-GFP-Luc, est observée après administration du substrat de l'enzyme, la luciférine en i.p. à la dose de 75 mg/kg. Après 5 min d'incubation, les souris SCID sont placées sous anesthésie gazeuse dans un Bioimager™, afin de mesurer le nombre de photons de luminescence pendant 5 min dorsalement puis ventralement.

Aucun signal de luminescence n'a été observé en ce qui concerne la lignée Z138-Luc dans les souris SCID, (Figure 31).

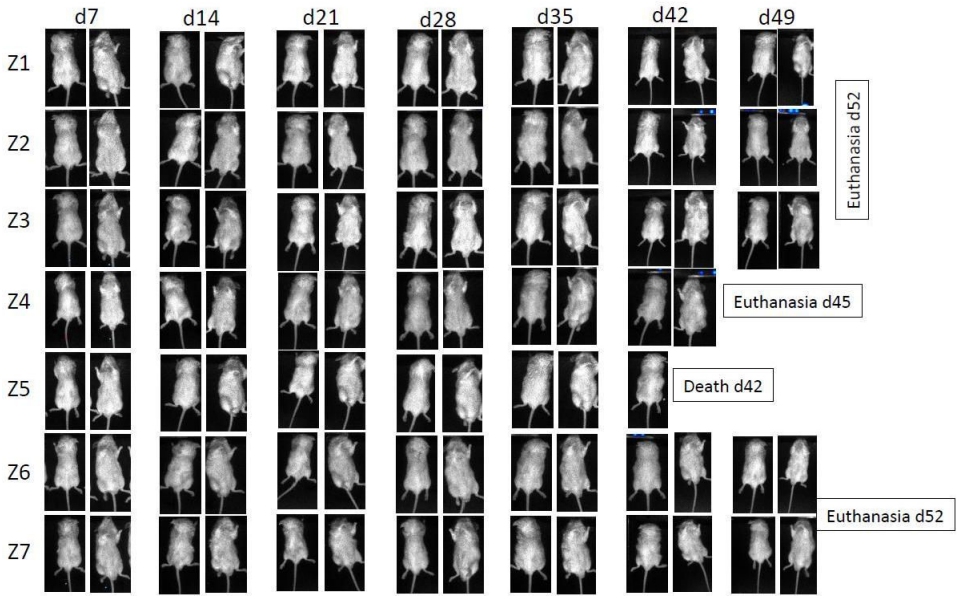


Figure 31 : Cinétique d'évolution du signal de bioluminescence sur la lignée de LCM Z138-GFP-Luc dans des souris SCID : La luminescence émise par les cellules JeKo-mCherry-Luc, est observée après administration du substrat de l'enzyme, la luciférine en i.p. à la dose de 75 mg/kg. Après 5 min d'incubation, les souris SCID sont placées sous anesthésie gazeuse dans un Bioimager^{TM}, afin de mesurer le nombre de photons de luminescence pendant 5 min dorsalement puis ventralement.

4. Analyses post-mortem

Après la mise à mort des animaux, les souris ont été autopsiées, leurs organes prélevés (en particulier , pour certains animaux en plus des organes hématopoïétiques, le cerveau, les reins, le système digestif (foie, intestin) (Figure 32A) etc.) afin de confirmer la présence des cellules tumorales. Les rates de chacun des animaux ont été pesées et mesurées. Des cas de splénomégalie ont été recensés pour quelques animaux comme c'est le cas pour la souris R7 (0.102 g) par comparaison avec les souris R1 (0.059 g) et R3 (0.044 g) (Figure 32B).

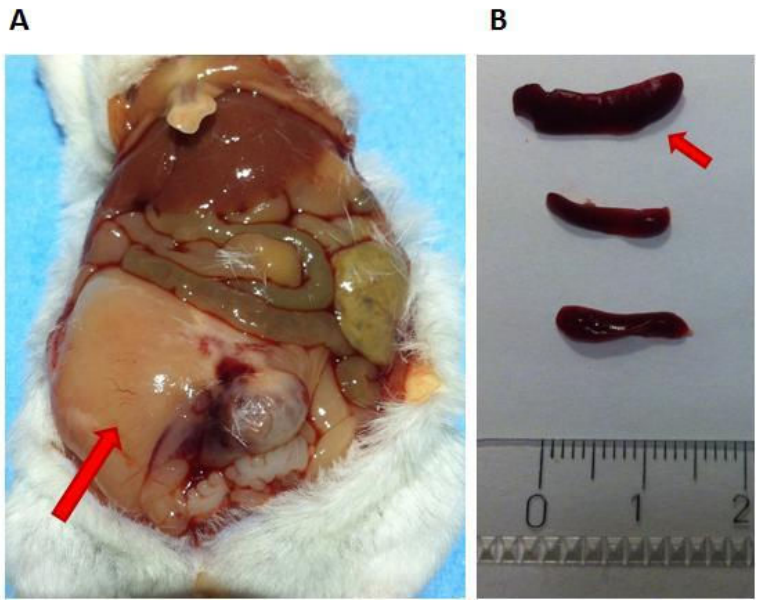


Figure 32 : Autopsie de la souris R7 : A. L'autopsie des souris montre une tumeur digestive pour la souris R7 (flèche rouge), souris SCID inoculée avec la lignée JeKo1-mcherry-Luc. **B.** une splénomégalie pour la souris R7 (flèche rouge), souris SCID inoculées avec la lignée Rec1-GFP-Luc.

Le degré d'infiltration tumorale a été objectivé par CMF après marquage des cellules. Les résultats obtenus avec la série de souris SCID sont indiqués dans la Figure 21A. Par exemple, dans la souris J7, souris SCID injectée avec la lignée JeKo1-mCherry-Luc , 22% de cellules CD19 + et 25% de cellules CD45+ sont présentes dans la rate, 5% de cellules CD19+ et CD45+ sont présentes dans la moelle osseuse du fémur. Aucune cellule tumorale n'a été détectée dans le sang (Figure 21B).

De manière globale quasiment toutes les rates des souris SCID présentaient un infiltrat tumoral. La localisation au niveau de la moelle osseuse du fémur n'était pas systématique mais lorsqu'elle était présente révèlait un nombre de cellules tumorales important, plus important que les taux retrouvés dans les rates. La rate et la moelle osseuse des os long sont des organes hématopoïétiques primaires, à ce titre ils présentent un microenvironnement favorable à la croissance des cellules de LCM. La présence de cellules tumorales dans le sang n'a quasiment jamais été détectée, exception faite pour la souris R7 qui présentait une très importante masse tumorale au niveau digestif, comme présenté dans la figure 33. Le cerveau peut également être

un site de métastase des LCM, retrouver des cellules tumorales à ce niveau n'est donc pas aberrant (148).

A

souris	rate (%)	moelle osseuse (%)	sang (%)	autres localisations (%)
G1	5.7	nd	nd	
G2	5.87	nd	nd	
G3	6.85	nd	nd	
G4	/	43	/	
G5	nd	nd	nd	
G6	nd	4.6	nd	
G7	3.38	17.7	nd	tumeur patte gauche 74.3
J7	21.6	4.69	nd	
R1	12.92	14.28	<1	
R3	15.8	36.58	<1	
R5	14.9	nd	nd	
R6	14.9	nd	nd	
R7	6.8	36.4	91.4	tumeur digestive 89.6
Z1	8.1	nd	nd	
Z2	8.93	nd	nd	
Z3	13.21	nd	nd	
Z4	17.85	nd	nd	
Z6	12.23	nd	nd	
Z7	12.49	nd	nd	

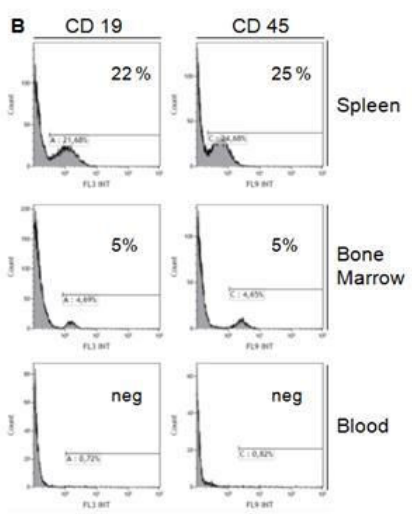


Figure 33. Données de cytométrie après analyses des organes des souris euthanasiées. A. Le tableau récapitule les données de CMF. Les cellules ont été isolées des organes indiqués par dissociation mécanique filtration et hémolyse puis marquées avec des anticorps anti CD19-PE et CD 45-Vioblue®. B. Exemple de profils de CMF obtenus pour les échantillons de rate, de moelle osseuse et de sang de la souris J7.

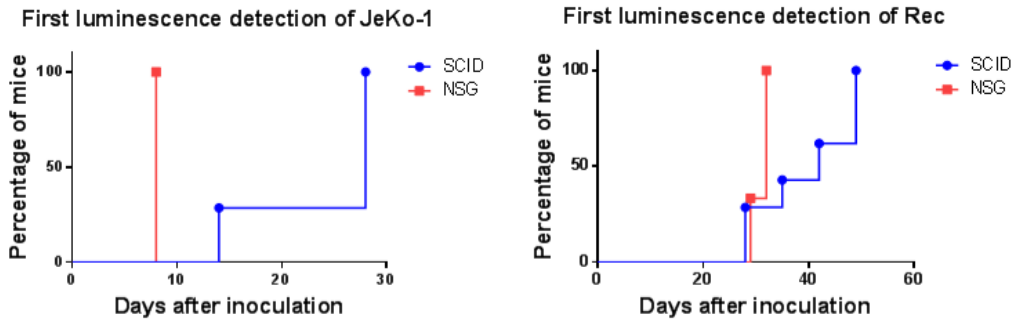
5. Comparaison des lignées et des souches murines

En comparant les résultats obtenus pour les deux souches de souris, nous observons que pour les lignées Rec1-GFP-Luc et Jeko1-mcherry-Luc, la détection du premier signal de luminescence, sur le même bioluminomètre est plus précoce pour les souris NSG (Figure 34A). Ce résultat était attendu car les souris NSG sont plus immunodéficientes que les souris SCID, facilitant d'autant la prise de greffe. En effet, les souris NSG, comme les souris SCID, n'ont pas de réponse immunitaire adaptative (ni LT ni LB). Mais elles n'ont pas non plus de macrophages, ni lymphocytes NK, ni cellules dendritiques, ni de complément. Nous observons également qu'il existe une hétérogénéité dans l'apparition du premier signal de bioluminescence entre les lignées Jeko1-mcherry-Luc et Rec1-GFP-Luc. Ce premier signal apparait plus précocement dans les lignées JeKo1-mcherry-Luc et ce, dans les deux souches de souris SCID (J14 *vs*. J28) et NSG (J9 *vs*. J29). Cela suggère que la lignée JeKo1-mcherry-Luc est plus agressive et a un pouvoir

d'invasion supérieur. Cette différence de cinétique est importante à prendre en compte. En effet, afin de ne pas atteindre les points limites de souffrance de l'animal, la fin du protocole aura lieu à des temps différents en fonction des lignées de LCM, afin de maximiser la pertinence des résultats et le bien-être animal.

En croisant les informations obtenues par bioluminescence et par CMF, nous avons répertorié l'ensemble des localisations tumorales pour les quatre lignées cellulaires testées : Granta-GFP, JeKo1-mCherry-Luc, REC1-GFP-Luc et Z138-Luc (Figure 34B). Nous avons ainsi montré que toutes les souris présentaient au moins une localisation tumorale à la fin du protocole et que dans la grande majorité des souris, la rate était envahie, la moelle osseuse dans une moindre mesure, mais avec cependant parfois un infiltrat tumoral très important. Les cellules de LCM ont cependant rarement été détectées dans le sang et toujours dans de faibles proportions.

A



B

		Spleen	Bone Marrow	Blood	at least one localisation
SCID	Granta-519	5/7	2/6	0/6	6/7
	JeKo-1	1/1	1/1	0/1	6/6
	Rec	4/5	3/5	1/5	6/6
	Z138	6/6	0/6	0/6	6/6
NSG	Granta-519	2/2	2/2	2/2	2/2
	JeKo-1	3/3	3/3	1/3	6/6
	Rec	1/3	2/3	0/3	6/6
	Z138	3/3	3/3	0/3	6/6

Figure 34 . Apparition au cours du temps et localisation des cellules tumorales dans les modèles de xénogreffe. A. Comparaison de l'apparition du premier signal de bioluminescence détectable entre les souches murines SCID et NSG pour les lignées JeKo1-mcherry-Luc et Rec1-GFP-Luc (Figures 16 à 18). Courbe de survenue d'évènements binaires réalisées avec le logiciel Prism®. **B.** Recensement du nombre de souris présentant une population tumorale dans la rate, la moelle et le sang par cytométrie. La colonne de droite récapitule les animaux qui présentent une population

tumorale dans au moins un des organes étudiés en cytométrie ou au moins un signal de bioluminescence.

La validation de ces deux modèles, que nous discuterons un peu plus tard, nous a permis et va nous permettre d'évaluer in vivo l'efficacité de molécules dans la prise en charge du LCM.

B. Les agonistes aux ERβ n'ont pas d'effet *in vitro* et *in vivo* sur les cellules de lymphome du manteau

Nous avons, grâce au modèle *in vivo* décrit précédemment, pu évaluer l'efficacité de plusieurs molécules sur des cellules LCM. Tout d'abord nous avons évalué l'efficacité de deux agonistes aux ERβ : le diarylpropionitrile (DPN) et l'ERB-041.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article sous la forme d'une lettre à l'éditeur soumis pour publication à la revue Leukemia & Lymphoma (en revue le 12/09/17).

LETTER TO THE EDITOR

A mouse model of disseminated mantle cell lymphoma highlights a lack of activity of estrogen receptor β agonists toward tumor burden

Simon Body,[1] Anna Esteve-Arenys,[2] Clara Recasens-Zorzo,[2] Xavier Troussard,[1,3] Gaël Roué[2,4] & Brigitte Sola[1,*]

[1] Normandie Univ, INSERM UMR1245, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France

[2] Division of Hematology and Oncology, IDIBAPS, Barcelona, Spain

[3] Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU Côte de Nacre, Caen, France

[4] Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

* Corresponding author: Brigitte Sola. Address: MICAH team, UFR Santé, CHU Côte de Nacre, 14032 Caen Cedex, France. Mail : brigitte.sola@unicaen.fr

Mantle B lymphoma (MCL) is a rare, still incurable, aggressive malignant hemopathy of mature B cells [1]. In the bone marrow and secondary lymphoid organs, tumor cells are connected with their environment (stromal cells, endothelial cells, osteoblasts, osteoclasts, immune cells, etc.) by cytokines, adhesion proteins and their respective receptors [2]. These interactions are responsible for a mechanism known as CAM-DR (cell adhesion-mediated drug resistance) [2]. This is why current therapies attempt to target both tumor cells and the tumor microenvironment (TME).

Estrogens regulate numerous physiological processes through their binding to estrogen receptors (ER) of α and β-types. However, while activated ERα enhances cell proliferation, activated ERβ inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Normal and malignant immune cells express both types of ER but predominantly ERβ [4]. This property has been successfully used to selectively inhibit growth and induce apoptosis in an *in vivo* model of lymphoma [5]. In this study, the Granta-516 mantle cell lymphoma (MCL) cell line was engrafted s.c. into *nude* mice. Treatment of mice with diarylpropionitrile (DPN) led to the inhibition of tumor cell growth. The biological effects of DPN were mediated by the inhibition of BAFF (B-cell activating factor) and GBR7 (growth factor receptor-bound protein 7) survival factors, and VEGF (vascular endothelial growth factor or VEGF), an angiogenic factor.

According to the dependency of MCL cells with their TME, we suspected that MCL tumor cells-stroma interactions would not be the same for MCL cells engrafted s.c. or in their physiological niche. We engineered four cell lines: JeKo1-mCherry-Luc, Z138-Luc, REC1-GFP-Luc and Granta519-GFP from their respective parental cell lines. Cells were then injected i.v. into NOD-SCID IL2Rγnull (NSG) mice (n = 6). All animals recapitulated *bona fide* MCL disease. Tumor cells having luciferase activity were detected by bioluminescence imaging (BLI) with a kinetics dependent of each cell line: JeKo1 being the most aggressive and REC1 the less aggressive cells BLI examination indicated that tumor cells housed in hematopoietic organs (bone marrow, spleen) and, in some cases, in non-hematopoietic organs (liver, lung, kidney). The identity of tumor cells was verified at the time of mice euthanasia by cytometry analysis of CD20+ cells purified from infiltrated organs (Table 1).

We analyzed the expression of ERα and ERβ on a panel of MCL cells both at the mRNA and protein levels. ERα mRNAs were absent or very low in all cell lines (data not shown) according to previous data [5]. In contrast, ERβ was expressed in all MCL cell lines (including JeKo1, Granta-519, REC1 and Z138) tested although at various levels (Fig 1A). We next assessed *in vivo* the effects of both DPN and ERB-041 (or 2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-7)vinyl-1,3-benzoxazol-5-ol), another selective ERβ agonist [6], on MCL dissemination and growth. Z138-Luc or REC1-GFP-Luc cells were injected in NSG mice. The same day, mice were separated into three groups (n = 3) receiving: vehicle (0.01% DMSO), DPN or ERB-041 both at the concentration of 1 mg/kg. Drugs and vehicle were injected i.p. 5 days a week. BLI was recorded each week starting at day 7. Mice were euthanized at day 31 (Z138) or day 41 (REC1). As shown Fig 1B, DPN or ERB-041 treatments did not change the engraftment properties of MCL tumor cells, since all mice were engrafted with luciferase-positive cells, or their homing, since infiltrated organs were the same in each group. Moreover, the number of CD20+ tumor cells in each organ was also similar between the three groups (not shown). In sharp contrast with published data [5], ERβ agonists have no effects on tumor cells growth.

One main action of DPN is to counteract migration and invasion [5]. We next tested the effect of ERB-041 and DPN on MCL cells in two *in vitro* assays : one dedicated to chemotaxis, the other one to invasion. Our data indicated clearly that ERB-041 and DPN had no inhibitory effects on migration (Fig 1C and Fig S1A) or invasion (Fig S1B).

Finally, since DPN was supposed to inhibit VEGF synthesis [5], we looked at the effects of DPN and ERB-041 on angiogenesis using the tube formation assay. As shown Fig 1D, the density of tubes was similar in the ERβ-targeted group than vehicle-group. ERβ agonists had no effect on the formation of structures resembling a microvasculature bed. We then measured VEGF synthesis in conditioned medium of cultured MCL cells treated with ERβ agonists or vehicle using ELISA (Fig S1C, Fig 1E). Our data confirmed that the quantity of VEGF secreted MCL tumor cells remained the same after DPN or ERB-041 treatments.

Subcutaneous injections are commonly used for the engraftment of human MCL cells in immunocompromised mice. However, this model is imperfect and does not recapitulate the interactions between the TME and tumor cells. In this study, we present a convenient and

reproducible *in vivo* model that reproduces human MCL pathology. After i.v. injection of engineered luciferase-expressing MCL cell lines, we observed that tumor cells preferentially colonize hematopoietic organs such as bone marrow and spleen, and other common metastatic sites such as brain and gut. The lack of *in vivo* effect of ERβ agonists in this pre-clinical model could be due to a protective CAM-DR. Indeed, in this *in vivo* model, MCL cells are in close contact with stromal cells delivering anti-apoptotic and pro-proliferative signals likely bypassing the effect of the drugs [7]. Alternatively, the pharmacokinetics distribution of ERβ agonists may be different in the model described here and the one of Yakimchuk and colleagues [5]. A low concentration of ERβ agonists could be present in the physiologic niches such as the bone marrow explaining the lack of efficiency for the treatment. Finally, the anti-angiogenic properties of ERβ agonists highlighted in the work of Yakimchuk and colleagues [5], may have a greater impact on the proliferation of tumor cells in the s.c. model, where the neovascularization is crucial to bring to the tumor nutriments and oxygen. By contrast, hematopoietic organs are less dependent on neovascularization.

However, our *in vitro* experiments confirmed that, although ERβ are well-expressed in the MCL cell lines, ERβ agonists had no effect on proliferation (data not shown), migration, invasion or VEGF production, emphasizing the *in vivo* results. Interestingly, we found previously that, although able to decrease multiple myeloma cell proliferation, ERβ agonists are inefficient *in vivo* [8].

In conclusion, our results highlight a lack of effects of ERβ agonists as single agents in mice. Nonetheless, as it has been described that estrogen play an important role in BCR pathway regulation [9], consequently further investigations would be required to assess the efficacy of ERβ agonists in association with B-cell receptor inhibitors, like ibrutinib.

Acknowledgements

The work has been financially supported by grants from ITMO *Biologie cellulaire, développement et évolution* (to BS), *Ligue contre le Cancer - Comité de l'Orne*, and *Fondo de Investigación Sanitaria* PI12/01847 and PI15/00102, European Regional Development Fund (ERDF) "*Una manera de hacer Europa*" (to GR). SiBo obtained a mobility grant from *Cancéropôle*

Nord-Ouest. AE-A and CR-Z were recipients of predoctoral fellowships from *Ministerio de Ciencia e Innovación and Instituto de Salud Carlos III* (grant PIE13/00033), respectively.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Authors contribution

SB, AE-A, and CR-Z performed the research and analyzed the data. XT provided essential support. GR and BS designed and supervised the study. SB and BS wrote the paper. All authors read the final version of the manuscript and agree with its content and submission.

References

1. Campo E & Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. Blood 2014; 125**:** 48–55.

2. Inamdar AA, Goy A, Ayoub NM, et al. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents. Oncotarget 2016; 7**:** 48692–48731.

3. Shain KH, Dalton WS, Tao J. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies. Oncogene 2015; 34: 4673–4682.

4. Yakimchuk K, Jondal M, Okret S. Estrogen receptor alpha and beta in the normal immune system and in lymphoid malignancies. Mol Cell Endocrinol 2013; 375**:** 121–129.

5. Yakimchuk K, Hasni MS, Guan J, et al. Inhibition of lymphoma vascularization and dissemination by estrogen receptor b agonists. Blood 2014; 123**:** 2054–2061.

6. Chaudhary SC, Singh T, Talwelkar SS, et al. Erb-041, an estrogen receptor beta agonist inhibits skin photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice by down-regulating WNT signaling pathway. Cancer Prevent Res 2014; 7: 186–198.

7. Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: Cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. Semin Cancer Biol 2011; 21: 308–312.

8. Fidalgo M, Ben Younes K, Body S, Ben Aissa-Fennira, Haelewyn B, Sola B. Agonists of estrogen receptor β have limited anti-myelome activity. Blood e-Letters, September 15, 2015. http://www.bloodjournal.org/content/123/13/2054

9. Ladikou EE, Kassi E. The emerging role of estrogen in B cell malignancies. Leuk Lymphoma. 2017; 58:528-539.

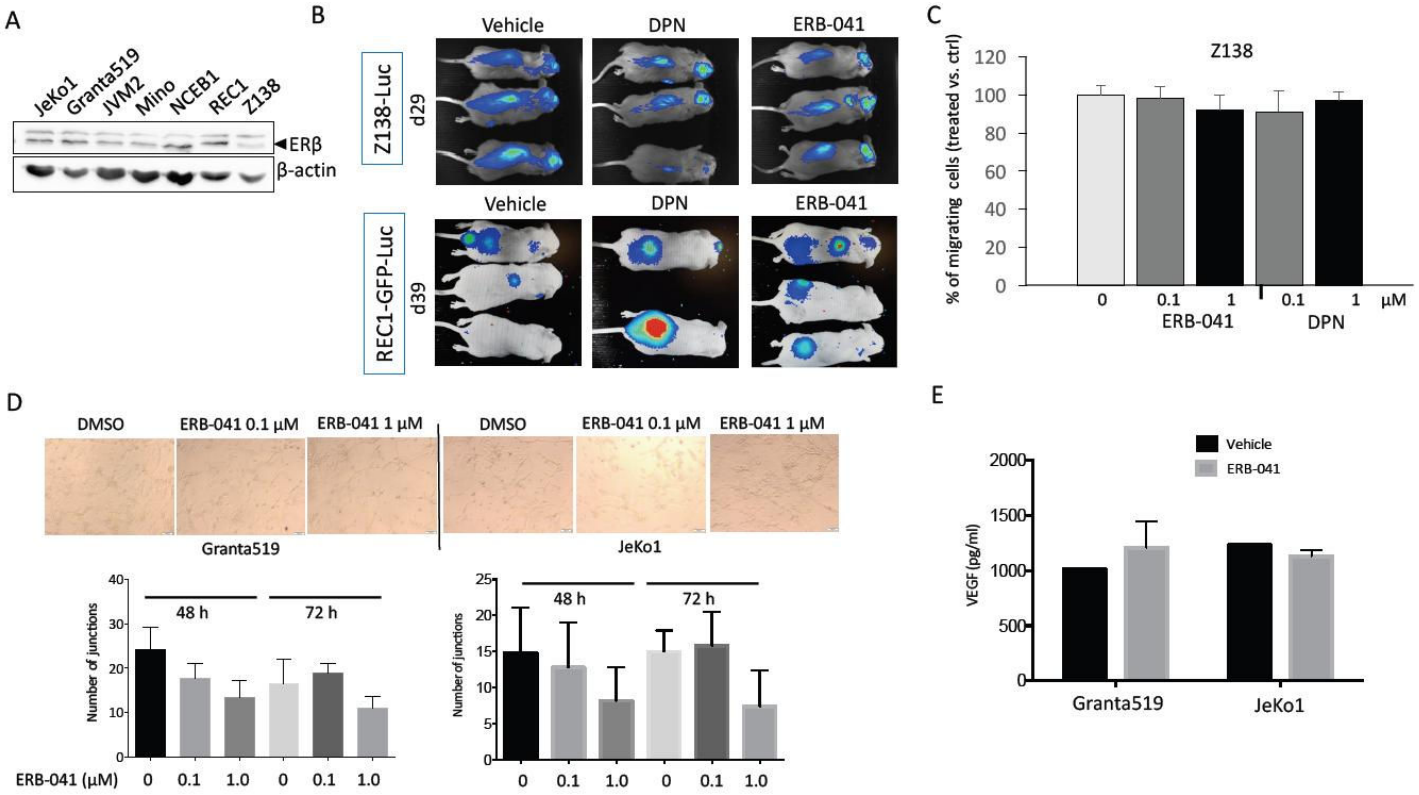


Figure 1. ERβ are present on MCL cells but ERβ agonists do not affect migration, invasion, nor angiogenesis

A. Proteins were purified from cultured MCL cells with the M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific), quantified, separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose paper and incubated with antibodies against ERβ (sc-8974, Santa Cruz Biotech.) or β-actin (sc-47778) as a control for gel loading and transfer. Our procedure has been described previously [10]. **B.** *In vivo* experiments were conducted in accordance with the recommendations of EEC (86/609/CEE). They were approved by the Animal Experimental Ethics Committee of our institution (UB-CEEA agreement 251/15). Z138-GFP-Luc, REC1-GFP-Luc, JeKo1-mCherry-Luc, and Granta519-GFP cell lines were engineered using lentivirus or retrovirus infections. Male NSG mice, n = 3 per group (age 6-8 weeks), were injected i.v. with 10^7 cells in a final volume of 100 µl. The same day, mice were separated into three groups receiving: vehicle (0.01% DMSO), DPN or ERB-041 both at the concentration of 1 mg/kg. Drugs and vehicle were injected i.p. 5 days a week. Tumor engraftment was determined weekly by bioluminescence imaging (BLI). Mice were injected i.p. with 75 mg/kg of D-luciferine and then analyzed with an Aequoria Luxiflux bioluminescent device equipped with an ORCA-ER camera (Hamamatsu). Mice were euthanized at day 31 (Z138) or day 41 (REC1), BLI recorded at that time for the various groups is shown. **C.** MCL cells were treated *in vitro* with DPN or ERB-041 (100 nM or 1 µM for 48 h or 72 h) or vehicle and assayed for migration. Cells (5 x 10^5 cells per insert) were suspended in RPMI 1640 medium containing 0.5% bovine serum

albumin (BSA). They were seeded in the top chamber of transwell inserts (Millicell® Hanging Cell Culture Inserts 5 µm PET, Millipore). Filters were transferred to wells containing RPMI 1640 medium with recombinant human stromal cell-derived factor 1 (SDF1, 200 ng/ml, R&D Systems) as chemoattractant. Plates were then incubated for 3 h at 37°C, and the number of cells migrated in the lower chambers was counted by flow cytometry. As an example, the results obtained for the Z138 cell line treated with 0.1 or 1 µM ERB-041 or DPN for 48 h are shown. The percentage of migrating cells (treated vs. vehicle) for each culture condition is plotted on the graph. **D.** HUVECs were plated onto a layer of Matrigel (BD Bioscience) at a density of 4 x 10^4 cells/well. Cells were treated with supernatants of ERB-041-treated (100 nM or 1 µM for 4 h) or vehicle-treated cells as control. After 24 h, tubular structures were photographed under a microscope (Olympus IX2-SL). Representative fields corresponding to JeKo1 and Granta519 cells are shown. The number of formed capillary tubes was counted in 11 independent fields of each well from each culture. The experiment has been done twice with triplicate samples. The number of tubes are plotted in the histograms. **E.** The concentration of VEGF was measured with an ELISA assay (Quantikine ELISA Human VEGF, R&D systems) using the supernatants of Granta 519 and JeKo-1 cells treated by ERB-041 (1 µM for 48 h) according to the manufacturer's recommendations. Samples were assayed in triplicate. The concentration of synthetized VEGF in each culture condition was deduced from the standard curve shown Fig S1C .

Table 1. Flow cytometry analysis of infiltrated organs in engrafted NSG mice

Cell line	Mouse	Spleen	Blood	Bone marrow	Liver	Lung	Kidney	Testis
JeKo1-mCherry-Luc*	J1	5	no	44	no	nd	nd	no
	J2	15	no	59	no	nd	nd	no
	J3	7	7	45	no	nd	nd	no
Z138-Luc**	Z3	22	no	68	no	nd	nd	nd
	Z4	24	no	75	no	nd	nd	nd
	Z5	38	no	82	no	nd	nd	nd
REC1-GFP-Luc***	R4	no	no	4	nd	nd	nd	nd
	R5	no	no	3	no	nd	nd	nd
	R6	no	no	3	nd	nd	nd	nd
Granta519-GFP†	G1	23	1	57	45	7	9	no
	G4	37	2	21	47	3	10	< 1

*, in the JeKo1-mCherry-Luc series, three mice were sacrificed at day. **, in the Z138-Luc series, three mice were sacrificed at day 30. ***, in the REC1-GFP-Luc series, three mice were sacrificed at day 33.†, in the Granta-GFP series, three mice died unexpectedly at day 17, two mice were sacrificed at the same day. At the time of euthanasia, indicated organs were collected; single-cell suspensions were prepared, then stained with IOTest® CD20-PE (phycoerythrin, IM1451, FL2) or

the corresponding isotype control and analyzed on an Attune acoustic focusing cytometer (Thermo Fisher Scientific). The percentage of positive cells in each organ is indicated in the table. no, no signal; nd, not done.

Additional methods

Cell culture

MCL cell lines have been described previously (Moros *et al*, 2014). Cell lines were maintained in culture in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10-20% FCS (PAA Laboratories), 2 mM L-glutamine and antibiotics (Lonza) in a humid atmosphere at 37°C. Cell authentication was done by short tandem repeat (STR) profiling (IdentiCell, Aarhus, Denmark).

Transwell migration and invasion assays

For migration assay, 5 x 10^5 cells in serum-free medium plus 0.5% BSA were added to the top chamber of 24-well inserts (Costar Transwell® Permeable Support, pore size 5 µm). For invasion assay, the same number of cells were seeded in transwell inserts coated with extra-cellular matrix ECM obtained from Engelbrecht-Holm-Swarm mouse sarcoma (Sigma-Aldrich). Medium supplemented with SDF1 (200 ng/ml) or not (for control), was added in the bottom chambers. Plates were incubated for 4 h (migration) or 24 h (invasion) at 37°C. Migrating and invaded cells present in the lower chambers were counted by flow cytometry. The accuracy of cell count was checked by the use of fluorescent particles added in the chambers (Accucount Fluorescent particles, SpheroTech).

Tube formation assay

HUVECs were plated onto a layer of Matrigel (BD Bioscience) at a density of 4 x 10^4 cells/well in 24-well plates. Immediately after, cells were treated with supernatants of DPN/ERB-041-treated (100 nM or 1 µM for 48 h) or vehicle-treated MCL cells. Cultures were observed 24 h later under an inverted microscope (Olympus IX2-SL, X 40 magnification) and the number of formed capillary tubes counted on 11 representative fields. A junction was recorded when a tube was bound to, at least, one another tube.

Western blotting

Whole cell lysates were prepared using a lysis buffer containing 1% NP-40, 20 mM Tris pH7.6, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (cOmplete ULTRA tablets, Roche). Methods used for SDS-PAGE and immunoblotting have been previously described (Moros et al, 2014).

MCL cells engraftment in immunocompromised mice

In vivo experiments were conducted in accordance with the recommendations of EEC (86/609/CEE). They were approved by the Animal Experimental Ethics Committee of our institution (UB-CEEA agreement 251/15 in Spain). Z138-GFP-Luc, REC1-GFP-Luc, JeKo1-mCherry-Luc, Granta519-GFP cell lines were engineered using lentiviruses or retroviruses. Male NSG (n = 6 per group) mice (age 6-8 weeks) were injected i.v. with 10^7 cells in a final volume of 100 µl. Tumor engraftment was determined weekly by bioluminescence imaging (BLI). Mice were injected i.p. with 75 mg/kg of D-luciferine and then analyzed with a PhotonImager™. Photon emissions were captured through the whole mouse body. At the end of the experiment mice were euthanized. Then, infiltrated organs were collected; single-cell suspensions were prepared, then stained with IOTest® CD20-PE (phycoerythrin, IM1451, FL2) or the corresponding isotype controls as recommended by the supplier.

For ERβ agonists treatment, mice were either engrafted with Z138-Luc or REC1-GFP-Luc. The same day, mice were separated into three groups (n=3 in each one), one receiving DPN (1 mg/kg), another ERB-041 (1mg/kg), and the last one vehicle (0.01% DMSO). Mice were treated five days a week. Mice of the Z138 group were euthanized at day 29, of the REC1 group, at day 39. BLI was recorded as mentioned before.

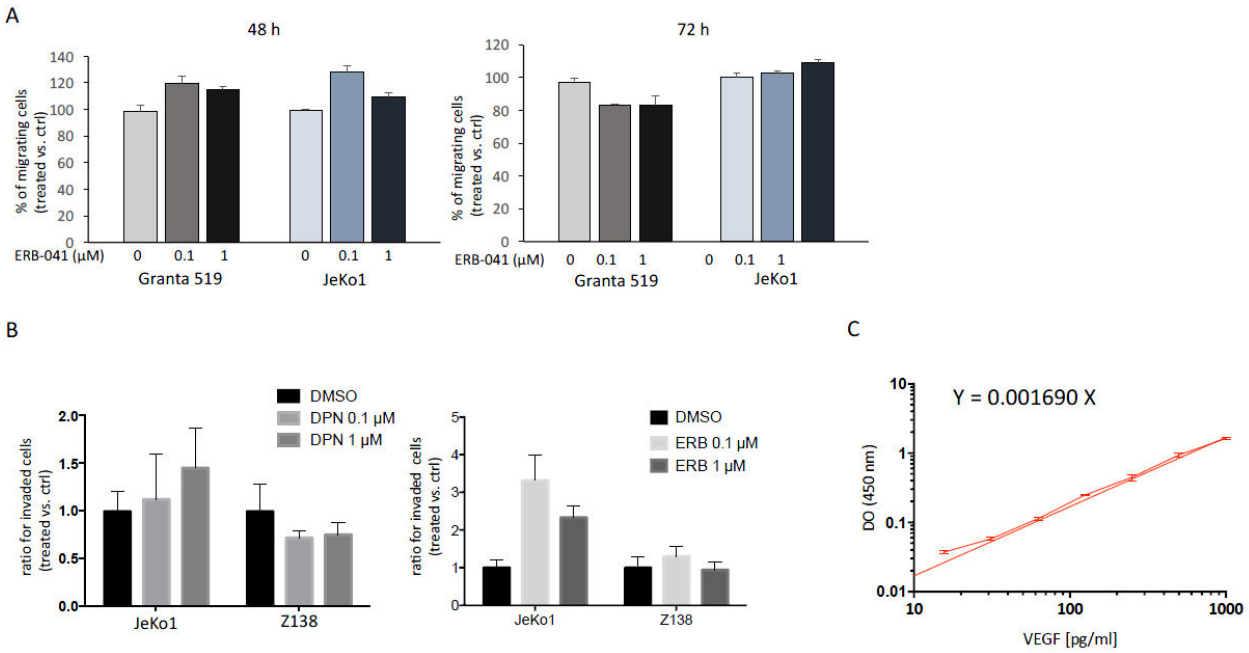


Figure S1

A. *In vitro* vehicle- or ERB-041-treated Granta519 and JeKo1 cells (48 h and 72 h) were seeded into the top chamber of transwell inserts. Inserts were transferred into wells containing medium with SDF1 and cells were allowed to migrate for 4 h. Cells present in the bottom well were then counted. Three independent inserts were seeded per experiment; the experiment was performed three times. The percentage of migrating cells ± SD was plotted on the graph.. **B.** JeKo1 and Z138 cells were treated with vehicle, DPN (0.1-1 µM) or ERB-041 (0.1-1 µM) for 48 h and seeded as in A in transwell inserts coated with extracellular matrix proteins. Inserts were transferred into wells containing medium with SDF1 and cells were allowed to migrate for 4 h. Cells present in the bottom well were then counted. The results are presented as in A. **C**. The quantification of produced VEGF was done using the Quantikine ELISA kit (R&D systems) according to the manufacturer' instructions on a Victor X4 plate-reader (Perkin Elmer). The standard curve was drawn from the OD at 450 nm of calibrated VEGF concentrations raging from 10^3 to 15.6 pg/ml.

Additional reference

Moros, A., Bustany, S., Cahu, J., Saborit-Villarroya, I., Martinez, A., Colomer, D., Sola, B. & Roué, G. (2014) Antitumoral activity of lenalidomide in *in vitro* and *in vivo* models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27KIP1 complexes. *Clinical Cancer Research*, **20,** 393–403.

C. La forme cytoplasmique de cycline D1 contrôle la migration et l'invasion des cellules de LCM

Concernant la localisation cytoplasmique de cycline D1, nous avons identifié 2 groupes distincts dans des lignées de LCM ainsi que dans des échantillons cellulaires de patients. Nous avons observé qu'une petit nombre des patients présentait une localisation cytoplasmique et nucléaire de cycline D1, quand le plus grand nombre des patients présentait une expression principalement nucléaire. Les patients présentant cette forme cytoplasmique étaient associés à une pathologie plus agressive. Nous avons donc cherché quel rôle pouvait posséder cette forme cytoplasmique de cycline D1. En réalisant une étude de protéomique, nous avons observé que 25% des protéines liées à la forme cytoplasmique cycline D1 appartenaient aux protéines du cytosquelette. L'organisation du cytosquelette est un élément clé des mécanismes de migration et d'invasion. Nous avons montré que dans les lignées de LCM, la forme cytoplasmique de cycline D1 est associée avec un potentiel plus important de migration et d'invasion. En séquestrant la cycline D1 au niveau nucléaire en utilisant un inhibiteur de XPO1, nous avons été en mesure de modifier ce potentiel d'invasion et de migration, *in vitro,* dans des lignées de LCM ainsi que de réduire la domiciliation et la croissance tumorale, *in vivo*, dans le modèle de xénogreffe murin ms en place au laboratoire. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la forme cytoplasmique de cycline D1 contrôle la migration et l'invasion des cellules de LCM.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article original soumis pour publication à la revue *Scientific Report* (en révision le 19/09/17).

Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells

Simon Body[1], Anna Esteve-Arenys[2], Hadjer Miloudi[1], Clara Recasens-Zorzo[2], Guergana Tchakarska[1,¶], Alexandra Moros[2], Sophie Bustany[1], Anna Vidal-Crespo[2], Vanina Rodriguez[2], Régis Lavigne[3], Emmanuelle Com[3], Isolda Casanova[4,5], Ramón Mangues[4,5], Oliver Weigert[6], Alejandra Sanjuan-Pla[7], Pablo Menéndez[5,8], Bénédicte Marcq[9], Jean-Michel Picquenot[1,9], Patricia Pérez-Galán[2], Fabrice Jardin[1,10], Gaël Roué[2,11] and Brigitte Sola[1,*]

[1]Normandie Univ, INSERM U1245, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France; [2]Division of Haematology and Oncology, IDIBAPS, Barcelona, Spain; [3]Plateforme protéomique - Protim, Biogenouest, Rennes, France; [4]Grup d'Oncogènes i Antitumorals, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau and Centro de Investigación Biomédica en Red, Barcelona, Spain; [5]Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Department of Biomedicine, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; [6]Medical Department III, University Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany; [7]Hematology Service, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; [8]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, ISCIII, Barcelona, Spain; [9]Service d'anatomie et cytologie pathologiques, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; [10]Département d'hématologie clinique, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; [11]Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

¶ Present address: Cytogenetics Laboratory, Research Institute, McGill University Health Centre, Montreal, Canada

* Corresponding author: Brigitte Sola, Equipe MICAH, UFR Santé, CHU Côte de Nacre, 14032 CAEN Cedex, FRANCE. Tel. +33 2 3106 8210. e-mail: brigitte.sola@unicaen.fr

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is a hematologic neoplasm characterised by the t(11;14)(q13;q32) translocation leading to aberrant cyclin D1 expression. The cell functions of cyclin D1 depend on its partners and/or subcellular distribution, resulting in different oncogenic properties. We observed the accumulation of cyclin D1 in the cytoplasm of a subset of MCL cell lines and primary cells. In primary cells, this cytoplasmic distribution was correlated with a more frequent blastoid phenotype. We performed immunoprecipitation assays and mass spectrometry on enriched cytosolic fractions from two cell lines. The cyclin D1 interactome was found to include several factors involved in adhesion, migration and invasion. We found that the accumulation of cyclin D1 in the cytoplasm was associated with higher levels of migration and invasiveness. We also showed that MCL cells with high cytoplasmic levels of cyclin D1 engrafted more rapidly into the bone marrow, spleen, and brain in immunodeficient mice. Both migration and invasion processes, both *in vivo* and *in vitro,* were counteracted by the exportin 1 inhibitor KPT-330, which retains cyclin D1 in the nucleus. Our data reveal a role of cytoplasmic cyclin D1 in the control of MCL cell migration and invasion, and as a true operator of MCL pathogenesis.

Introduction

The *CCND1* gene encoding cyclin D1 is the second most frequently amplified locus in solid cancers[1]. This gene is overexpressed in haematological cancers, due to t(11;14)(q13;q32) translocation, amplification of the *CCND1* gene, deletions or point mutations of the *CCND1* 3'-UTR, and even in the absence of any detectable genetic alteration[2]. Consistent with the well-known role of cyclin D1 in regulating the cell cycle through cyclin-dependent kinase (CDK)4/6 activation, tumour cells with high levels of cyclin D1 have high proliferation rates, linked to a lower nutrient requirement. However, the oncogenic function of cyclin D1 is unlikely to be solely due to an increase in proliferation. Indeed, depending on its subcellular distribution (nuclear, cytoplasmic, at the outer mitochondrial membrane) and its partners (transcription factors, chromatin-modifying enzymes, cytosolic proteins), cyclin D1 can regulate DNA damage response[3,4], chromosome duplication and stability[5,6], senescence[7], mitochondrial function[8,9] and migration[10-12], all key biological processes for cancer initiation and maintenance.

In mantle cell lymphoma (MCL), an aggressive form of non-Hodgkin B-cell lymphoma, cyclin D1 is aberrantly expressed due to the t(11;14)(q13;q32) translocation, resulting in the localisation of this protein principally in the nucleus, where it controls tumour cell proliferation[13]. However, we observed a preferential accumulation of cyclin D1 in the cytosolic compartment in a subset of primary tumour samples and cell lines. The accumulation of cyclin D1 in the cytoplasm is associated with the aggressive blastoid variant of MCL. It remains unclear whether cyclin D1 has other oncogenic functions in addition to its role in controlling cell proliferation. We investigated the role of cytosolic cyclin D1 in MCL cells, by performing a proteomic screen for cyclin D1 partners. An analysis of the proteins interacting with cyclin D1 revealed that cyclin D1 bound factors were involved in cell

migration, invasion and adhesion. We also found that cytoplasmic cyclin D1 was associated with higher levels of migration and invasion, *in vitro* and *in vivo*.

The migration and invasiveness of MCL cells can be reduced by treatment with KPT-330, a small inhibitor of nuclear export (SINE), which retains cyclin D1 in the nucleus. We suggest that SINEs could potentially be used as single agents or in combination with current drugs, as a promising therapeutic approach for invasive/metastatic MCL.

Results

Cyclin D1 accumulates in the cytoplasm in a subset of MCL lines and primary tumours

We analysed the subcellular distribution of cyclin D1 in MCL cells by immunofluorescence (IF), which revealed considerable heterogeneity between cell lines. Cyclin D1 was found mostly in the nucleus and partly in the cytoplasm of JVM2, Granta-519 (hereafter referred to as Granta), and REC1 cells, but mostly in the cytoplasmic compartment of JeKo1 and Z138 cells (Fig. 1A). These distributions of cyclin D1 were checked by immunoblotting (IB) purified cytoplasmic/nuclear fractions and total extracts (Fig. 1B, upper panel and Fig. S1A). JeKo1 and Z138 cells had the highest cytoplasmic cyclin D1 contents, whereas this protein was found in both the cytoplasmic and nuclear compartments in REC1 cells. In the other cells, cyclin D1 was mostly present in the nucleus. We estimated the ratio of cytoplasmic to total cyclin D1 by densitometry (Fig. 1B, lower panel). We confirmed the preferential cytoplasmic localisation of cyclin D1 in JeKo1 and Z138 cells, in which this ratio exceeded 1. We then investigated whether such heterogeneity in subcellular distribution was observed in primary cells from MCL patients. IB revealed an accumulation of cyclin D1 accumulated in the cytoplasm of primary tumour cells in one (#6414) of three MCL patients tested (Fig. S1B). A retrospective immunohistochemistry (IHC)

analysis on a cohort of 42 MCL patients followed at a single institution confirmed that staining for cyclin D1 defined two groups of patients: those with mostly nuclear staining (e.g. patient #1) and those with both nuclear and cytoplasmic staining (e.g. patient #2, Fig. 1C). The predominance of a cytoplasmic pool cyclin D1 is, thus, not rare in MCL.

Cytoplasmic cyclin D1 is a marker of MCL aggressiveness

We investigated the clinical relevance of the subcellular localisation of cyclin D1, by analysing clinical and histological features at the time of initial diagnosis, in the same cohort of patients with MCL. Overall, 6/42 (14%) cases presented both nuclear and cytoplasmic immunostaining for cyclin D1, whereas 36/42 (86%) displayed immunostaining limited to the nucleus. Cyclin D1 expression was never found only in the cytoplasm. Patients with cytoplasmic immunostaining for cyclin D1 were significantly more likely to have been diagnosed with the blastoid MCL variant[14] (33% *vs*. 3%, $p = 0.04$). All these patients had a Ki-67 index of more than 10%, suggesting a more proliferative disease (Table 1). For example, patient #2 (Fig. 1C) was diagnosed with a blastoid variant on the basis of morphological criteria and had a Ki-67 value of 66%. By contrast, the two groups did not differ significantly for the principal clinical features considered, such as splenomegaly, leukocytosis and bone marrow (BM) involvement (Table 1). The limited number of cases and the diverse treatments administered to the patients of this cohort precluded an analysis of overall and disease-free survival.

A proteomic-based interactome analysis reveals an extensive network of cyclin D1-interacting proteins

We investigated the main molecular functions of cytosolic cyclin D1 in MCL, by trying to identify factors interacting with cyclin D1 in JeKo1 cells. The partners of cyclin D1 may be common to different cyclin D1-expressing tumour cells[4]. We therefore included, for comparison, the U266 multiple myeloma (MM) cell line, in which *CCND1* is activated by the insertion of an enhancer element[15]. In these cells, cyclin D1 is overexpressed and present in both in the nucleus and the cytoplasm[9]. Cytosol-enriched extracts were purified from both cell lines, subjected to immunoprecipitation with an anti-cyclin D1 antibody (Ab), and the cyclin D1-containing complexes obtained were subjected to mass spectrometry. Proteomic data revealed a large number of putative cyclin D1-interacting factors in each cell line (Tables S1 and S2) in addition to cyclin D1 itself. For validation of our protocol, we compared these two sets of proteins with available datasets for the Granta MCL cell line[4]. We identified 66 proteins strictly identical in the three cell lines, and 17 belonging to the same family. These proteins were classified on the basis of their cellular functions, with the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) bioinformatics resources v6.7 (ref. 16). In addition to well-known cell cycle regulators (CDKs and CDKNs), cyclin D1 was found to interact with proteins involved in metabolism, transcriptional regulation, DNA repair, replication, protein folding, cell structure and organisation (Table S3). Some previously characterised partners of cyclin D1, such as PCNA, RAD51, HDAC and HSPs[17,18], were also detected in our dataset, validating our technical procedure.

The set of cytosolic partners of cyclin D1 is enriched in structural proteins

For identification of the most relevant cyclin D1-interacting factors in JeKo1 cells, , we performed functional clustering with DAVID tools[16] on the 200 proteins associated with cyclin D1 with the highest peptide coverage (Table S4). Interestingly, 51 of these proteins

were cytoskeleton-associated proteins (enrichment score: 13.16, *p*-value: 4.7 x 10^{-14}). We then classified the same 200 proteins with the PANTHER™ system (v12.0, ref. 19) on the basis of biological process, molecular function and protein class. The results are presented as pie charts, with the percentage of proteins within some relevant fractions. These results confirmed the DAVID findings (Fig. 2A). The network obtained with STRING (v10.5, ref. 20) summarised interactions between the previously characterised 51 proteins and cyclin D1. This analysis predicted a functional enrichment for the actin-filament-based process (pathway ID: gene ontology (GO) 0030029), with a false discovery rate of 7.69 x 10^{-11} (Fig. 2B). Immunoprecipitation (IP) experiments confirmed the binding of cyclin D1 to α-tubulin and β-actin proteins in JeKo1 cells (Fig. S1C), suggesting a potential functional role of cyclin D1 in the control of actin fibre organisation and microtubule dynamics. B cells transduced to overexpress a TAT-cyclin D1 fusion protein[9], displayed ultrastructural changes, such as a loss of protrusions (blebs) and a more regular cell surface (Fig. S1D), suggesting a link between cyclin D1 and cellular shape remodelling, which is crucial for the migratory/invasiveness phenotype.

Cytoplasmic cyclin D1 controls MCL migration and invasion, but not adhesion

Based on the potential role of cyclin D1 in regulating cellular shape through binding to structural proteins, we investigated the link between the processes of adhesion, migration and invasion, and cytoplasmic levels of cyclin D1.

The crosstalk between MCL cells and the stromal microenvironment in the BM and secondary lymphoid tissues plays an important role in the biology of the disease and is known to contribute to drug resistance[21]. In particular, MCL cells have high levels of adhesion molecules enabling them to interact with fibronectin and stromal cells[22]. We

therefore assessed the adhesion properties of MCL cells with fibronectin and HS-5 mesenchymal stromal cells. We found no correlation between cytosolic cyclin D1 level and the number of cells adhering to either fibronectin or HS-5 cells (Fig. S2A), ruling out a role for cytoplasmic cyclin D1 in MCL cell adhesion.

We assessed the ability of MCL cell lines to migrate over a gradient of stromal cell-derived factor 1 (SDF1), the relevant chemokine for MCL cells in chemotaxis assays[23]. JeKo1 and Z138 cells had a greater migratory capacity than MCL lines in which cyclin D1 was located in the nucleus, and REC1 cells did not migrate (Fig. 3A). This greater migratory capacity was associated with greater filamentous (F-) actin polymerisation and a broader F-actin distribution, as shown by rhodamine-phalloidin staining before and after stimulation with SDF1 (Fig. 3B). In addition to playing a role in cell migration[10-12,24], cyclin D1 has been associated with tumour invasiveness and metastasis [25]. Consistent with these findings, we observed that MCL cell lines with cytosolic cyclin D1 were more invasive in extracellular matrix (ECM)-coated invasion chambers and on an SDF1 gradient (Fig. 3C). These findings are supported by the results of a recent study showing that a cytoplasmic and membrane-associated form of cyclin D1 controls the invasiveness of tumour cells[26].

MCL cell lines have different engraftment kinetics in xenograft models

We then investigated the possible association of a cytoplasmic cyclin D1 distribution with greater invasiveness in MCL cells. We engineered three cell lines from JeKo1, Z138 and REC1 cells for expressing the green fluorescence protein (GFP) or mCherry and the luciferase reporter gene (see details in the Supplementary Information). The three cell lines (JeKo1-mCherry-Luc, Z138-GFP-Luc and REC1-GFP-Luc) were injected into the tail vein of either SCID or NOD/SCID/IL2Rγ^{null} (NSG) immunodeficient mice. Tumour growth was monitored weekly

by bioluminescence imaging (BLI) after the i.p. injection of D-luciferin. Indeed, areas of luciferase activity are the sign of tumour growth. Based on sequential BLI measurements, tumours grew exponentially overtime, for the whole mouse as well as for individual luminescent foci (data not shown). The three cell lines invaded their pathophysiological niches, including the spleen and BM, and non-haematopoietic tissues, such as the brain and gut, with 100% penetrance (as shown in Fig. 4A and Table S5), thereby faithfully reproducing the features of MCL disease. Organ specimens showing luciferase activity contained tumour cells as assessed by flow cytometry analysis of GFP+/mCherry+ and CD20+/CD45+ cells (Fig. 4B). IHC on representative BM biopsy specimen confirmed the presence of cyclin D1+/CD20+ tumour cells. Representative tumour sections from the Jeko1 series showed an intense cytoplasmic cyclin D1 staining (Fig. 4C). Interestingly, marked differences were observed between the three cell lines in terms of lymphoid tissues-homing kinetics. Indeed, JeKo1 and Z138 cells had a higher engraftment capacity in NSG mice, and, to a lesser extent, SCID mice, than REC1 cells, and this engraftment also occurred earlier (Fig. 4D, Table S5). We thus conclude that the accumulation of cyclin D1 in the cytoplasmic compartment is associated with a higher invasion capacity *in vivo*.

The nuclear retention of cyclin D1 alters the invasiveness/migratory properties of MCL cells *in vitro*

Cyclin D1 is a cargo of XPO1, a major nuclear export protein[27]. We found that XPO1 was strongly expressed in both in the nuclear and cytosolic compartments of MCL cells, as expected from its function as a nuclear exportin (Fig. S2B). We treated JeKo1 cells with the SINE, KPT-330 and followed the redistribution of cyclin D1 over time. Cyclin D1 was strictly nuclear by 4 h after SINE treatment and remained nuclear 24 h later (Fig. 5A). The migratory

capacities of JeKo1 and Z138 cells were analysed after a KPT-330-treatment. For both cell lines, significantly fewer cells migrated when cyclin D1 was retained into the nuclear compartment (Fig. 5B). Moreover, the blockade of cyclin D1 export from the nucleus led to a clear inhibition of F-actin polymerisation and changes in F-actin distribution (Fig. 5C). Similarly, both KPT-330 and leptomycin B (LMB), another SINE, decreased the invasiveness of these two cell lines (Fig. 5D). To further confirm these data, the JVM2 cell line that has low levels of cyclin D1 expression (Fig.1B) were chosen as the recipient for transient transfections. Three kinds of plasmids were transfected by electroporation : p-EGFP encoding the green fluorescent protein (GFP) as a control, pD1a-EGFP encoding the canonical long form of cyclin D1 and pD1b-EGFP encoding a short isoform of cyclin D1. This short isoform lacks the Thr286 residue that is necessary for nuclear export by XPO1 and degradation by the ubiquitin/proteasome system[2]. In turn, cyclin D1b accumulates in the nucleus. We assessed the capacity of transfected cells to migrate in the chemotaxis assay. As shown Fig. 5E, cyclin D1 expression increased the migration capacity of cells. However, this increased capacity is statistically higher for the long cyclin D1 isoform than the short nuclear isoform. Cytoplasmic cyclin D1 thus seems to be required to promote chemotaxis and MCL cell invasion *in vitro*.

The nuclear relocalisation of cyclin D1 alters the invasiveness/migratory properties of MCL cells *in vivo*

For validation of the *in vitro* data, SCID mice (*n* = 5 per group) received intravenous injections of JeKo1-mCherry-Luc cells. They were then treated twice weekly with KPT-330 or vehicle and analysed by BLI once weekly (Fig. 6A). Tumour cells grew exponentially over time in both groups, but with a very different kinetics (Fig. 6B and C). Indeed, BLI results were

positive in three of the five mice in the control group as soon as day 14 after the injection of the cells, and all mice displayed luciferase activity at day 21, with a pattern consistent with BM infiltration (femur, tibia, rachis areas). By contrast, on day 21, luciferase activity was detected in only two of the five mice in the KPT-330-treated group, and the BLI signal was restricted to extramedullary organs, such as the brain and abdominal regions. Flow cytometry confirmed that spleen and BM biopsy specimens from animals treated with vehicle were enriched in CD20+/CD45+ tumour cells, whereas tumour cells were detected in the brains of only two mice and in the spleen of only one mouse treated with KPT-330 (Table 2). Accordingly, tumour cell infiltration into the BM was almost completely prevented in KPT-330-treated mice, as shown by IHC labelling for cyclin D1 and CD20 cells in representative biopsy specimens from both groups (Fig. 6D). Interestingly, in the few surviving CD20+ tumour cells, cyclin D1 accumulated in the nucleus (compare Fig.6D and Fig. 3C). Thus, the nuclear retention of cyclin D1 delayed the onset of MCL cells engraftment, impaired tumour growth and altered tumour cells homing towards the lymphoid compartments. These *in vivo* data confirm the crucial role of the subcellular distribution of cyclin D1 In tumour cell engraftment and invasion.

Discussion

The *CCND1* gene is the second most frequently amplified locus in the human genome[1] and its product, the cyclin D1 protein, is overexproduced due to various genetic alterations, including translocations, mutations, oncogenic activation, and the deletion of miRNA-binding sites[2]. In association with CDK4/6, cyclin D1 controls the cell cycle and proliferation. Cyclin D1 is an oncogenic driver for several solid tumours and haematological malignancies, but has also non-canonical oncogenic properties, as demonstrated by two

previous proteomic screens[4,28]. We carried out a proteomic screen in a cyclin D1-expressing cell model, to characterise the partners of cyclin D1 responsible for these non-canonical oncogenic features. A comparison of cyclin D1 interactomes in MCL cells (JeKo1 and Granta) and in MM cells (U266)revealed that cyclin D1 bound to factors involved in DNA repair (such as PCNA and RAD51), the heat shock response (HSPs, DNAJs), transcriptional regulation (HDACs), and to structural proteins. Most of these cyclin D1 partners in B-cell lymphoma and myeloma cells, are also present in solid tumours (breast cancer, squamous cell carcinoma and colorectal cancer)[4], further validating our technical protocol. Our data confirm that non-canonical, CDK-dependent and -independent cyclin D1 functions are common to many cancer cells.

More importantly, our analysis of the most frequently identified partners of cyclin D1 in JeKo1 cells revealed a complex network of cytoskeleton-associated proteins. Using *in vitro* and *in vivo* devices, we identified an unexpected function of cyclin D1 in cell remodelling and in turn, migration and invasiveness. This finding is consistent with those of a recent study showing that a cytoplasmic form of cyclin D1 artificially attached to the cell membrane controls invasiveness[29]. Cyclin D1/CDK4 complexes interact and phosphorylate the scaffold protein filamin A, a member of the actin-binding protein family, thereby controlling the invasion potential of breast cancer cells[30]. In prostate cancer cells, cytoplasmic cyclin D1/CDK4 complexes phosphorylate paxillin, a structural component of focal adhesions[29]. Consistent with these findings, we found that the treatment of MCL cells with high levels of cytoplasmic cyclin D1 with the CDK4 inhibitor palbociclib reversed the invasive phenotype (Fig. S2C), suggesting that the kinase activity associated with cyclin D1 is required for MCL cell invasion. However, we found no evidences for the phosphorylation of paxillin, filamin A or cofilin, another actin-associated protein for which phosphorylation by cyclin D1/CDK4

complexes is involved in cell motility[31] (data not shown). The downstream targets of cytoplasmic cyclin D1/CDK4 dimers regulating migration/invasion remains unknown, but our proteomic data identify the characterized cytoskeleton-associated proteins as possible effectors.

KPT-185 and KPT-286, two XPO1 inhibitors, block the proliferation and induce the apoptosis of MCL cell lines and primary cells *in vitro* [32,33]. *In vivo*, the oral administration of KPT-276 also suppresses the growth of subcutaneous xenografts tumours[32]. We describe here the effect of KPT-330 in a mouse model reproducing the pathogenic features of human MCL. We found that KPT-330 impaired MCL cells engraftment and migration to the pathophysiologic niches of these cells. Consistent with our data, KPT-330 has been shown to inhibit SDF1-mediated signalling, preventing the migration of CLL cells[34], and to restrict tumour spreading and the metastasis of prostate cancer cells by decreasing the secretion of metalloproteinases and urokinase[35].

In KPT-330-treated mice, in addition to the lower engraftment potential of MCL cells, we found that the brain replaced the haematopoietic organs as the most frequently infiltrated organ. We interpret this finding as indicating that alterations occur to the factors required for MCL homing, such as chemokines, chemokine receptors, integrins, and sphingosine 1 phosphate receptors, after the relocalisation of cyclin D1 (and possibly other XPO1 cargos) to the nucleus. Thus, tumour cells avoid haematopoietic organs because they cannot interact with their protective microenvironment. KPT-330 effects on the entry, retention and egress of MCL cells may be indirect and mediated by proteins such as cyclin D1, controlling motility and invasiveness.

Cyclin D1 has a heterogeneous subcellular distribution in MCL cell lines and primary tumour cells, but its presence in the cytoplasm does not mean that it is excluded from the

nucleus. The nuclear functions of cyclin D1 (essentially, regulation of the cell cycle and transcription) are therefore maintained in cells with a high cytoplasmic cyclin D1 content. The nuclear relocalisation of cyclin D1 associated with CDK4 has been recognised as a mechanism for controlling proliferation in solid tumours[24,25,30]. Our data, therefore, strongly suggest that tumour cells proliferation may be controlled by nuclear cyclin D1, whereas tumour cells invasiveness may be controlled by the cytoplasmic fraction of the protein. Consistent with this conclusion, Fusté and colleagues reported that the attachment of cyclin D1 at the cytoplasmic membrane of tumour cells had no effect on proliferation but increased tumour invasion and metastasis[29].

Further studies are required, but our finding of different oncogenic properties associated with different subcellular distributions of cyclin D1 at diagnosis in MCL patients could up new possibilities for personalised treatment. In particular, the combination of KPT-330 or next-generation SINEs with currently available proteasome inhibitors, such as bortezomib or carfilzomib, might decrease the aggressiveness of MCL tumour cells, limiting their spread. The maintenance of malignant cells outside of their niches would leave these cells more accessible to chemotherapy.

Methods

Antibodies

Antibodies (Abs) against cyclin D1 (sc-718), β-actin (sc-4778), PARP (poly(ADP-ribose) polymerase, sc-8007) and exportin 1 (XPO1, sc-5595) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. An Ab against α-tubulin (T6199) was purchased from Sigma-Aldrich, and an anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Ab (GAPDH, clone 6C5) was obtained from Life Technologies. Abs against hexokinase 2 (#2106), and binding immunoglobulin protein

(BiP, #3183) were obtained from Cell Signaling Technologies. ImmunoPure peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG (H+L) secondary Abs were purchased from Pierce Protein Research Products.

MCL patients and analysis of cyclin D1 localization

We assessed the clinical relevance of the subcellular distribution of cyclin D1 protein, by retrospectively analysing cyclin D1 immunostaining patterns by IHC (anti-cyclin D1 Ab, EP12, Dako) of specimen from a cohort of 42 cyclin D1+ MCL cases followed at a single institution and reported in a previous study[36]. The clinical and histological features of cases were compared according to their cyclin D1 staining patterns (nuclear *vs*. nuclear + cytoplasmic) were compared (Table 1).

Cells culture and transfection

The MCL cell lines have been described elsewhere[37]. CM cells, used as a control, are immortalised and untransformed mature B cells. Cell lines were maintained in culture in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10-20% foetal calf serum (PAA Laboratories), 2 mM L-glutamine and antibiotics (Lonza), under a humid atmosphere at 37°C. Cell authentication was based on short tandem repeat (STR) profiling (IdentiCell, Aarhus, Denmark).

The pEGFP-N1 plasmid was purchased from Clontech Laboratories Inc., and the pD1a-EGFP and pD1b-EGFP[38] plasmids were kindly provided by D.A. Solomon (USCF, San Franscico, CA). Both were sequenced to check the integrity of the coding sequence. Plasmids were amplified and purified (QIAGEN Plasmid Midi Kit). JVM2 cells (7 x 10^6 cells) were cultured without antibiotics for 24 h. Cells were resuspended in 100 µl of Nucleofector Solution V

(Lonza) containing 2 µg of purified plasmids. JVM2 cells were transfected with a Nucleofector II device (Lonza) using the A-023 program. After transfection, cells were transferred to culture plates in complete culture medium and assayed for migration 48 h later as described below. At that time, the transfection efficiency (recorded by the number of GFP+ cells) was verified using the NucleoCounter TM-3000 according to the recommendations of the supplier (Chemometec).

Transwell migration and invasion assays

Cultured MCL cells (5 x 10^5 cells per insert) were suspended in RPMI 1640 medium containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and used to seed the top chamber of Transwell inserts (Millicell® Hanging Cell Culture Inserts 5 µm PET, Millipore). The inserts were transferred to wells containing RPMI 1640 medium supplemented with recombinant SDF1 (200 ng/ml, R&D Systems) as a chemoattractant, as previously described[23]. As a control for assay specificity, SDF1-free medium was added to the lower chamber. Plates were then incubated for 4 h at 37°C, and cells migrating to the lower chambers were counted by flow cytometry. The accuracy of cell counting was checked by adding fluorescent particles to the chambers (Accucount fluorescent particles, SpheroTech).

For invasion assays, 5 x 10^5 cells in serum-free medium plus 0.5% BSA were added to the top chamber of 24-well inserts (Costar Transwell® Permeable Support, pore size 5 µm) coated with ECM obtained from Engelbrecht-Holm-Swarm mouse sarcoma (Sigma-Aldrich). Medium supplemented with SDF1 (200 ng/ml) or without supplementation (for control), was added to the bottom chamber. Plates were incubated for 24 h at 37°C. The invading cells present in the lower chambers were counted by flow cytometry.

LMB (L2913) was purchased from Sigma-Aldrich, and KPT-330 (S7232) from SelleckChem. For migration and invasion assays, cells were treated with either 5 ng/ml LMB or 300 nM KPT-330 for 4 h before their addition to the Transwell inserts.

Indirect immunofluorescence, F-actin staining and confocal microscopy analysis

MCL cells were cytospun, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.5% Triton-X100. The slides were then stained with an anti-cyclin D1 Ab (sc-718, Santa Cruz Biotechnology), and then with Alexa Fluor® 633-conjugated goat anti-rabbit IgG (in green) and counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Molecular Probes®, in blue). Slides were observed with a confocal fluorescence microscope (Fluoview FV 100, Olympus). For XPO1 inhibition, cells were treated with KPT-330 for 4 or 24 h before IF analysis.

Cultured cells were either left untreated or treated with 200 ng/ml SDF1 to stimulate chemotaxis. Fixed and permeabilized cells were incubated with rhodamine-phalloidin, as recommended by the supplier (Molecular Probes) and analysed by fluorescence microscopy. In some experiments, SDF1-treated cells were also treated with 300 nM KPT-330 (or vehicle) for 4 h before F-actin staining.

Immunoprecipitation and immunoblotting

Whole-cell protein extracts were prepared from cultured cells with the M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology) according to the manufacturer's instructions. Fractions enriched in cytosol were prepared with a lysis buffer containing 1% NP40, 20 mM Tris pH 7.6, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (cOmplete ULTRA tablets, Roche). Cytoplasmic and nuclear extracts were

prepared with the Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (BioVision). Extract purity was checked by IB with Abs directed against the strictly nuclear PARP protein, and the endoplasmic reticulum-bound BiP protein. The methods used for IB and IP have been described in details elsewhere[37].

Affinity purification, mass spectrometry, protein characterization

These methods are described in details in the Supplementary Information.

Engraftment of GFP/mCherry-Luc expressing MCL cells in immunocompromised mice

In vivo experiments were conducted in accordance with the recommendations of the EEC (86/609/CEE). They were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of our institutions (CENOMEXA agreement N109-11-12/32/11-15 in France and UB-CEEA agreement 251/15 in Spain). Z138-GFP-Luc, REC1-GFP-Luc, JeKo1-mCherry-Luc cell lines were generated by infection with lentivirus or retrovirus vectors (see Supplementary Information). Male SCID (n = 5-7 per group) and NSG (n = 6 per group) mice (age 6-8 weeks) received an i.v. injection of 10^7 cells in a final volume of 100 µl. Tumour engraftment was assessed weekly by BLI. Mice received an i.p. injection of 75 mg/kg of D-luciferin and were then examined with a PhotonIMAGER™ (Biospace lab) for 5 min. Ventral plus dorsal emissions were captured through the whole mouse body. When the mice were killed, their infiltrated organs were collected. Single-cell suspensions were prepared and stained with IOTest® CD20-PE (phycoerythrin, IM1451, FL2) or anti-CD45-VioBlue® (clone 5B1, Miltenyi Biotech., FL9) Abs, or with the corresponding isotype controls. Cells were also directly analysed for GFP or mCherry fluorescence by flow cytometry. In addition, BM biopsy specimens were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin for IHC analyses according to

previously published procedures[37]. Human tumour B-cell detection procedures were performed on consecutive tissue sections, with anti-cyclin D1 (EP12) and anti-CD20 (L26) primary Abs (Dako). Preparations were examined under an Olympus DP70 microscope equipped with of a 40/0.75 NA objective and DPManager software v2.1.1 (Olympus).

For analysis of the effects of KPT-330 on cell engraftment, SCID mice (n = 10) received i.v. injections of JeKo1-mCherry-Luc cells as described above. On the day of the injection, the mice were assigned to two groups receiving either orally a 10 mg/kg dose KPT-330 or i.p. an equal volume of vehicle twice weekly. Mice underwent BLI once per week, beginning one week after cell injection. When the mice were killed, their infiltrated organs were removed and processed for flow cytometry and IHC analyses.

Statistical analyses

The Student's *t*-test was used to determine the significance of differences between two experimental groups. Data were analysed in two-tailed tests, with $p < 0.05$ (*) considered to be significant. Fisher's exact test was used to evaluate the distribution of the various histological and clinical parameters between MCL cases as a function of cyclin D1 immunostaining pattern.

References

1. Beroukhim, R. *et al*. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. **463**, 899–905 (2010).

2. Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., Sutherland, R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **11**, 558–572 (2011).

3. Li, Z. *et al*. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res*. **70**, 8802–8811 (2010).

4. Jirawatnotai, S. *et al*. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein

interactome analyses in human cancers. *Nature*. **474**, 230–234 (2011).

5. Zeng, X. *et al*. The Ras oncogene signals centrosome amplification in mammary epithelial cells through cyclin D1/Cdk4 and Nek2. *Oncogene*. **29**, 5103–5112 (2010).

6. Casimiro, M. C. *et al*. ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. *J. Clin. Invest*. **122**, 833-843 (2012).

7. Brown, N. E. *et al*. Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium. *Cancer Res*. **72**, 6477–6489 (2012).

8. Sakamaki, T. *et al*. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biol*. **26**, 5449–5469 (2006).

9. Tchakarska, G., Roussel, M., Troussard, X. & Sola, B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B Cells. *Cancer Res*. **71**, 1690–1699 (2011).

10. Neumeister, P. *et al*. *Cyclin D1* governs adhesion and motility of macrophages. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 2005–2015 (2003).

11. Li, Z. *et al*. Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27KIP1. *Cancer Res*. **66**, 9986–9994 (2006).

12. Li, Z. *et al*. Alternate cyclin D1 mRNA splicing modulates p27KIP1 binding and cell migration. *J. Biol. Chem*. **283**, 7007–7015 (2008).

13. Pérez-Galán, P., Dreyling, M. & Wiestner, A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. **117**, 26–38 (2011).

14. Swerdlow, S.H. *et al*. In Bosman, F.T., Jaffe, E.S., Lakhani, S.R. & Ohgaki, H., eds. Word Health Organization classification of tumours. Lyon, France, IARC, 2008.

15. Gabrea, A., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Shou, Y. & Kuehl, W.M. Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. *Mol. Cell.* **3**, 119-123 (1999).

16. Huang, D. W., Sherman, B.T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc*. **4**, 44–57 (2008).

17. Casimiro, M. C., Velasco-Velázquez, M., Aguirre-Alvarado, C. & Pestell, R. G. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **23**, 295-304 (2014).

18. Hydbring, P., Malumbres, M. & Sicinski, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **17**, 280–292 (2016).

19. Mi, H., Muruganujan, A. , Casagrande, J.T. & Thomas, P.D. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc*. **8**, 1551-1566 (2013).

20. Szklarczyk, D. *et al*. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucl. Acids Res*. **45**, D362-D368 (2017).

21. Burger, J. A. & Ford, R. J. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin. Cancer Biol*. **21**, 308–312 (2011).

22. Kurtova, A. V., Tamayo, A. T., Ford, R.J . & Burger, J. A. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. **113**, 4604–4613 (2009).

23. Xargay-Torrent, S. *et al*. Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering B-cell receptor signaling and protein translation in mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 586-597 (2012).

24. Meng, H. *et al*. PACSIN 2 represses cellular migration through direct association with cyclin D1 but not its alternate splice form cyclin D1b. *Cell Cycle*. **10**, 73–81 (2011).

25. Fernández, R., Ruiz-Miró, M., Dolcet, X., Aldea, M. & Garí, E. Cyclin D1 interacts and collaborates with Ral GTPases enhancing cell detachment and motility. *Oncogene*. **30**, 1936–1946 (2011).

26. Fusté, N. P. *et al*. Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer. *Oncotarget*. **7**, 26979–26991 (2016).

27. Ishizawa, J., Kojima, K., Hail, N. Jr., Tabe, Y. & Andreeff, M. Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance (CRM1) protein. *Pharmacol. Ther*. **153**, 25–35 (2015).

28. Bienvenu, F. *et al*. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature*. **463**, 374–378 (2010).

29. Fusté, N.P. *et al*. Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. *Nat. Commun*. **7**, 11581 (2016).

30. Zhong, Z. *et al*. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Res*. **70**, 2105–2114 (2010).

31. Li, Z. *et al*. Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4240-4256 (2006).

32. Zhang, K. *et al*. Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma. *Exp. Hematol*. **41**, 67–78.e4 (2013).

33. Yoshimura, M. *et al*. Induction of p53-mediated transcription and apoptosis by exportin-1 (XPO1) inhibition in mantle cell lymphoma. *Cancer Sci*. 105, 795–801 (2014).

34. Zhong, Y. *et al*. Selinexor suppresses downstream effectors of B-cell activation, proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 28, 1158–1163 (2014).

35. Gravina, G. *et al*. XPO1/CRM1-selective inhibitors of nuclear export (SINE) reduce tumor spreading and improve overall survival in preclinical models of prostate cancer (PCa). *J. Hematol. Oncol*. **7**, 46 (2014).

36. Jardin, F. *et al*. Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *Br. J. Haematol*. **146**, 607–618 (2009).

37. Moros, A. *et al*. Antitumoral activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27KIP1 complexes. *Clin. Cancer Res*. **20**, 393–403 (2014).

38. Solomon, D. A. *et al*. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J. Biol. Chem*. **278**, 30339-30347 (2003).

Acknowledgements

We thank Anne Barbaras (*Université de Caen Normandie*, Caen, France) for help with cell culture, Dr Aránzazu Chamorro-Jorganes (IDIBAPS, Barcelona, Spain) for help in the establishment of GFP-expressing cell lines**,** Dr Antonio Postigo (IDIBAPS) for the gift of the pMSCV-Luc2-PKG-Neo-IRES-GFP plasmid, Dr David A. Solomon (UCSF, San Francisco, CA) for the gift of pD1a-GFP and pD1b-GFP plasmids, and Dr Benoît Haelewyn (CURB, *Université de Caen Normandie*) for advice concerning mice. We thank ICORE and Cyceron (*Université de Caen Normandie*) for microscopy, cytometry, and imaging facilities. The work was supported by grants from ITMO *Biologie cellulaire, développement et évolution* (to BS), *Ligue contre le Cancer - Comité de l'Orne* (to BS), and *Fondo de Investigación Sanitaria* PI12/01847 and PI15/00102, European Regional Development Fund (ERDF) "*Una manera de hacer Europa*" (to GR). Research in the PM laboratory is supported by the European Research Council (CoG-2014-646903), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF-SAF2013-43065), the *Obra Social La Caixa-Fundaciò Josep Carreras*, and The *Generalitat de Catalunya*

(SGR330). PM is an investigator of the Spanish Cell Therapy cooperative network (TERCEL). SBo obtained a mobility grant from *Cancéropôle Nord-Ouest*. AE-A and CR-Z held predoctoral fellowships from the *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte and Instituto de Salud Carlos III* (grant PIE13/00033), respectively.

Authors Contributions

Si.Bo., A.E.-A., H.M., C.R.-Z., G.T., A.M., So.Bu., A.V.C., V.R. and B.M. acquired data. Si.Bo., A.E.-A., H.M., C.R.-Z., G.T., A.M., So.Bu., J.M.P., P.P.-G., F.J., G.R. and B.S. analysed and interpreted the data. R.L., E.C., I.C., R.M., O.W., A.S.-P. and P.M. developed the methodology. G.R. and B.S. designed the study and directed the overall project. G.R. and B.S. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper.

The authors declare that they have no competing interests.

Figure legends

Fig. 1. Cyclin D1 may be preferentially distributed in the cytoplasm

A, MCL cells were cytospun on glass slides, stained with an anti-cyclin D1 primary Ab and a goat Alexa Fluor® 488 conjugate anti-mouse IgG as secondary Ab, and counterstained with DAPI. The slides were analysed by confocal microscopy (x 180, magnification). **B**, upper panel, cultured MCL cells were harvested. Whole-cell and cytosolic extracts were obtained, subjected to SDS-PAGE and analysed by IB with the indicated Abs. Anti-β-actin Ab was used

as a loading control. An anti-PARP Ab was used to verify the purity of cytoplasmic extracts. Lower panel, IB experiments were carried out three times. Total and cytoplasmic cyclin D1 levels were estimated by densitometry (ChemiDoc XRS+, ImageLab software, Bio-Rad). The background of each image was subtracted from the bands of interest, then the density of each protein of interest was normalized against the density of control housekeeping β-actin protein. The ratio of cytoplasmic to total cyclin D1 level was calculated for each cell line for each gel. The mean values are reported in the table. **C**, cyclin D1 staining of two biopsy specimens from MCL patients (x 20, magnification).

Figure 2. Cytoskeleton-associated proteins interact with cyclin D1 in JeKo1 cells

The 200 proteins with the highest peptide coverage (Table S4) were analysed by DAVID Bioinformatics Resources v6.7 (ref. 16). Relevant proteins were uploaded using their UniProt ID and organised into functional groups by the tool, according to GO terms. Among them, 51 were cytoskeleton-associated proteins (enrichment score: 13.16, *p*-value: 4.7×10^{-14}). **A,** the same 200 proteins were next clustered with the PANTHER™ classification system v12.0 according to their associated biological processes, molecular functions and protein classes (www.pantherdb.org, ref. 19). Results are presented as pie charts, with the percentage of proteins for some of the more relevant fractions. **B,** the network designed with STRING (v10.5, www.string-db.org, ref. 20) summarises associations between the 51 proteins previously characterised and cyclin D1. This analysis predicted functional enrichment in actin-filament-based processes (pathway ID: GO 0030029), with a false discovery rate of 7.69×10^{-11}.

Figure 3. Cytoplasmic cyclin D1 controls the invasion and migration of MCL cells *in vitro*

A, MCL cells were used to seed the top chamber of Transwell inserts. The inserts were transferred into wells containing medium supplemented with SDF1 and the cells were allowed to migrate for 4 h. The cells present in the bottom well were then counted. Three independent inserts were used per experiment and each experiment was performed three times. The mean numbers of migrating cells ± s.d. are plotted on the graph. ***, $p < 0.001$ in Student's *t*-test. **B**, MCL cells were left untreated (controls) or treated with SDF1 (200 ng/ml for 4 h), then cytospun, fixed and permeabilized. F-actin was visualised with rhodamine-stained phalloidin by confocal microscopy (Fluoview FV 1000 confocal microscope and Fluoview Viewer software, Olympus). Nuclei were counterstained with DAPI (x 180, magnification). **C**, cultured MCL cells were used to seed the ECM-coated 5 µm-pore membranes of Transwell inserts, in the top chamber, containing serum-free medium. The inserts were then placed in wells containing SDF1 as a chemoattractant and incubated for 24 h. The cells invading the lower chamber were counted by flow cytometry. The means ± s.d. of three independent experiments with triplicate samples are indicated on the graph. ***, $p < 0.001$ in Student's *t*-test.

Figure 4. MCL cells display variable engraftment properties

A, we injected 10^7 MCL cells into the caudal veins of six-week-old SCID mice, and BLI analyses were performed, starting one week after cell injection. Mice receiving JeKo1-mCherry-Luc (J) or REC1-GFP-Luc (R) cells underwent imaging on the dorsal (D) and ventral (V) sides at successive time points. Images obtained 35 days after cell injection (at the time of death) are presented. **B**, cells were isolated from the BM and spleen and fluorescence signals were recorded by flow cytometry. The percentages of GFP^+ or $mCherry^+$ fluorescent cells on flow cytometry profiles are shown for R3, R7 and J7 mice. Isolated cells were also

stained with anti-CD20-PE and anti-CD45-Vioblue Abs and analysed by flow cytometry. The numbers of $CD20^+$ or $CD45^+$ cells in the bone marrow of R3, R7 and J7 mice are indicated on the figure. **C**, haematoxylin/eosin staining (H&E) and IHC analyses of BM biopsy specimens from JeKo1-inoculated mice showing the presence of $CD20^+$ and cyclin $D1^+$ human tumour cells (x 200, magnification). **D**, the percentages of SCID mice (left panel) and NSG mice (right panel) displaying luciferase activity as a function of time after injection are presented on Kaplan-Meyer curves drawn with Prism v6.0 software (GraphPad).

Figure 5. The inhibition of cyclin D1 export impairs both the migration and invasion of MCL cells *in vitro*

A, JeKo1 cells were treated with 300 nM KPT-330 and analysed by IF after 4 h or 24 h , to determine the distribution of cyclin D1. We used an anti-cyclin D1 as primary antibody and a goat Alexa Fluor® 488 conjugated anti-mouse IgG secondary Ab. Slides were counterstained with DAPI and analysed by confocal microscopy (x 180, magnification). **B**, JeKo1 and Z138 cells cells were treated with vehicle or KPT-330 (300 nM for 4 h) and then used to seed the upper chamber of Transwell inserts. The inserts were transferred to medium containing SDF1 and the cells were allowed to migrate for 4 h. The cells present in the bottom well were then counted. The data were normalised as a percentage of the control value. Three independent inserts were used per experiment and the experiment was performed three times. The mean numbers of migrating cells ± s.d. are plotted on the graph. ***, $p < 0.001$ in Student's *t*-tests. **C**, F-actin staining with rhodamine-phalloidin was performed on JeKo1 and Z138 cells stimulated with 200 ng/ml SDF1 for 4 h alone or together with 300 nM KPT-330. Cells were counterstained with DAPI before examination (x 180, magnification). **D**, JeKo1 and Z138 cells were treated with 5 ng/ml LMB, 300 nM KPT-330, or vehicle as a control for 4 h

and then assayed for invasion, as described above. The data were normalized as a percentage of the control value. The experiment was carried out three times (LMB), or twice (KPT-330), with triplicate samples. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ in Student's *t*-tests. **E**, JVM2 cells were transfected with either pEGFP, pD1a-EGFP or pD1b-EGFP expression plasmids using the Nucleofector II device (solution V, program A-023). After a 48 h-recovery period, the transfection efficiencies were estimated using the NucleoCounter NC-3000. Transfected cells were assayed for migration as described above. The experiment was performed twice with quadruplicate samples. The means ± s.d. are indicated on the graph, ***, $p < 0.001$ in *t*-tests.

Figure 6. The inhibition of cyclin D1 export impairs MCL engraftment *in vivo*

A, we injected 10^7 mCherry-Luc-JeKo1 cells i.v. into six-week-old male SCID mice ($n = 10$). Mice were randomised to two groups ($n = 5$). One group received KPT-330 (10 mg/kg) orally twice weekly, whereas the other group received vehicle i.p. Both treatments began on the day of cell injection and BLI analyses began one week later. Mice were imaged on the dorsal and ventral sides once weekly after the i.p injection of D-luciferin. Images of individual mice (1-5) from both groups (KPT-330 and vehicle) are presented. Mice were killed after the last BLI images were obtained (day 35). **B**, the graph shows the Tukey boxplots for individual BLI data as a function of time after cell injection for the two groups. **C**, at the end of the experiment, the blood, spleen, lower limbs and brain of each mouse were collected and tumour cells were analysed by IHC. Staining for cyclin D1 and CD20 on BM biopsy specimens of one mouse per group are shown. Enlarged boxes: representative cyclin D1 nuclear staining (x 800, magnification).

Table 1. Correlation between clinical/histological features and cyclin D1 localization for MCL patients

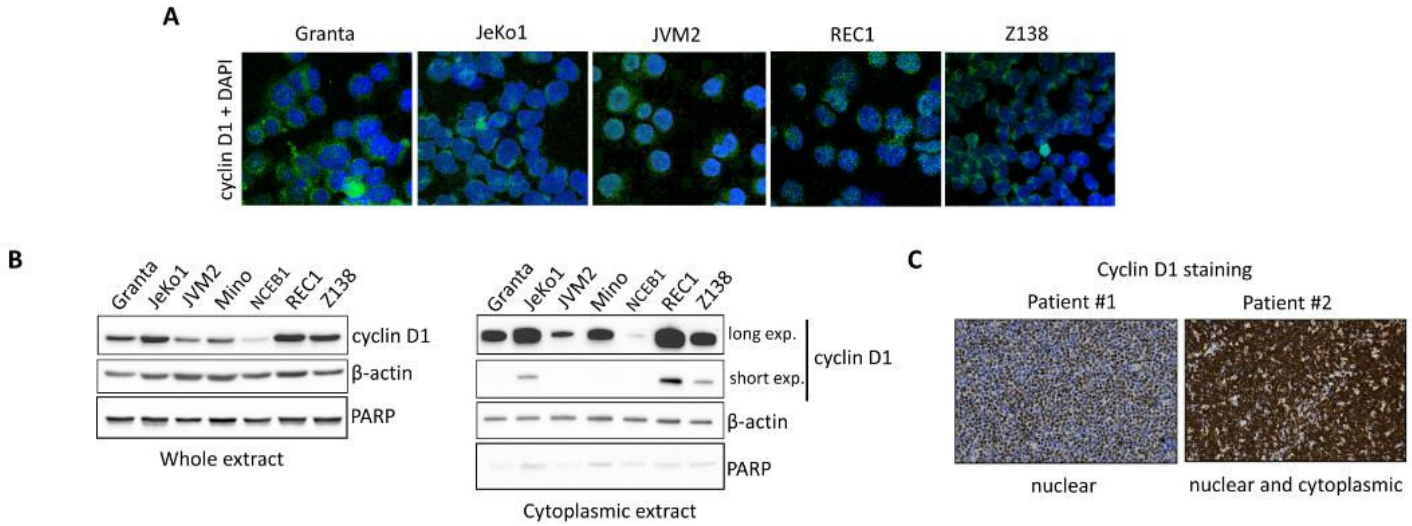
MCL patients	Cyclin D1 immunostaining		*p*
	Nucleus	Nucleus/cytoplasm	
	n = 36	n = 6	
Clinical features			
Median age (range)	68 (40-85)	54 (33-72)	0.101
Male (%)	18/35 (51%)	5/6 (83%)	0.20
Median MIPI[a] (range)	7.2 (4.8-10.7)	8.6 (5.3-10)	0.92
BM involvement	23/33 (69%)	3/6 (50%)	0.38
Stage IV (%)	28/33 (84%)	4/6 (66%)	0.29
Leukocytosis > 10 Giga/L (%)	11/33 (33%)	3/6 (50%)	1
Splenomegaly (%)	11/33 (33%)	2/6 (33%)	1
Histological features			
Ki-67 > 10%	22/36 (61%)	**6/6 (100%)**	0.15
Blastoid variant	1/36 (3%)	2/6 (33%)	**0.048**

[a]MIPI, mantle cell lymphoma international prognostic index. *p* was calculated in Fisher's exact test. $p < 0.05$ was considered significant.

Table 2. Percentage of tumour cells in various organs from control (C1-5) and KPT-330 treated (K1-5) SCID mice

Mouse	Organ	% of CD20+ cells	% of CD45+ cells
C1	Brain	< 1	< 1
	BM	33	34
	Spleen	61	64
	Blood	3	nd[a]
C2	Brain	< 1	<1
	BM	22	21
	Spleen	62	65
	Blood	11	nd
C3	Brain	2	2
	BM	53	60
	Spleen	78	79
	Blood	5	nd
C4	Brain	2	1
	BM	62	63
	Spleen	78	79
	Blood	4	nd
C5	Brain	7	4
	BM	11	10
	Spleen	nd	nd
	Blood	< 1	1.0
K1	Brain	0	0
	BM	< 1	< 1
	Spleen	3	< 1
	Blood	< 1	< 1
K2	Brain	1	1
	BM	< 1	< 1
	Spleen	< 1	< 1
	Blood	< 1	<1
K3	Brain	2	3
	BM	< 1	< 1
	Spleen	< 1	< 1
	Blood	< 1	< 1
K4	Brain	< 1	< 1
	BM	< 1	< 1
	Spleen	< 1	< 1
	Blood	< 1	< 1
K5	Brain	5	6
	BM	< 1	< 1
	Spleen	< 1	< 1
	Blood	< 1	< 1

JeKo1-mCherry-Luc cells were injected into the caudal vein of 10 SCID mice, which were then randomised into two groups: a control group (C series) and a group receiving KPT-330 (K series). K1-5 mice were treated orally, twice weekly, with 1 mg/kg KPT-330. The overall distribution of MCL tumor cells was determined by BLI during the time course of the experiment and analysed by flow cytometry at the time of mouse death (day 35 after cells injection for all mice except C5, which was killed on day 28). Cells were isolated from the organs indicated and stained with CD20-PE or CD45-VioBlue Abs. The percentage of stained cells was deduced from the cytometry profiles analyzed with the Kaluza software v1.5A. [a] nd, not determined.



Ratio: cytoplasmic cyclin D1/total cyclin D1						
Granta	JeKo1	JVM2	Mino	NCEB1	REC1	Z138
0.85	**1.70**	0.81	0.85	0.47	1.00	**1.26**

Fig. 1

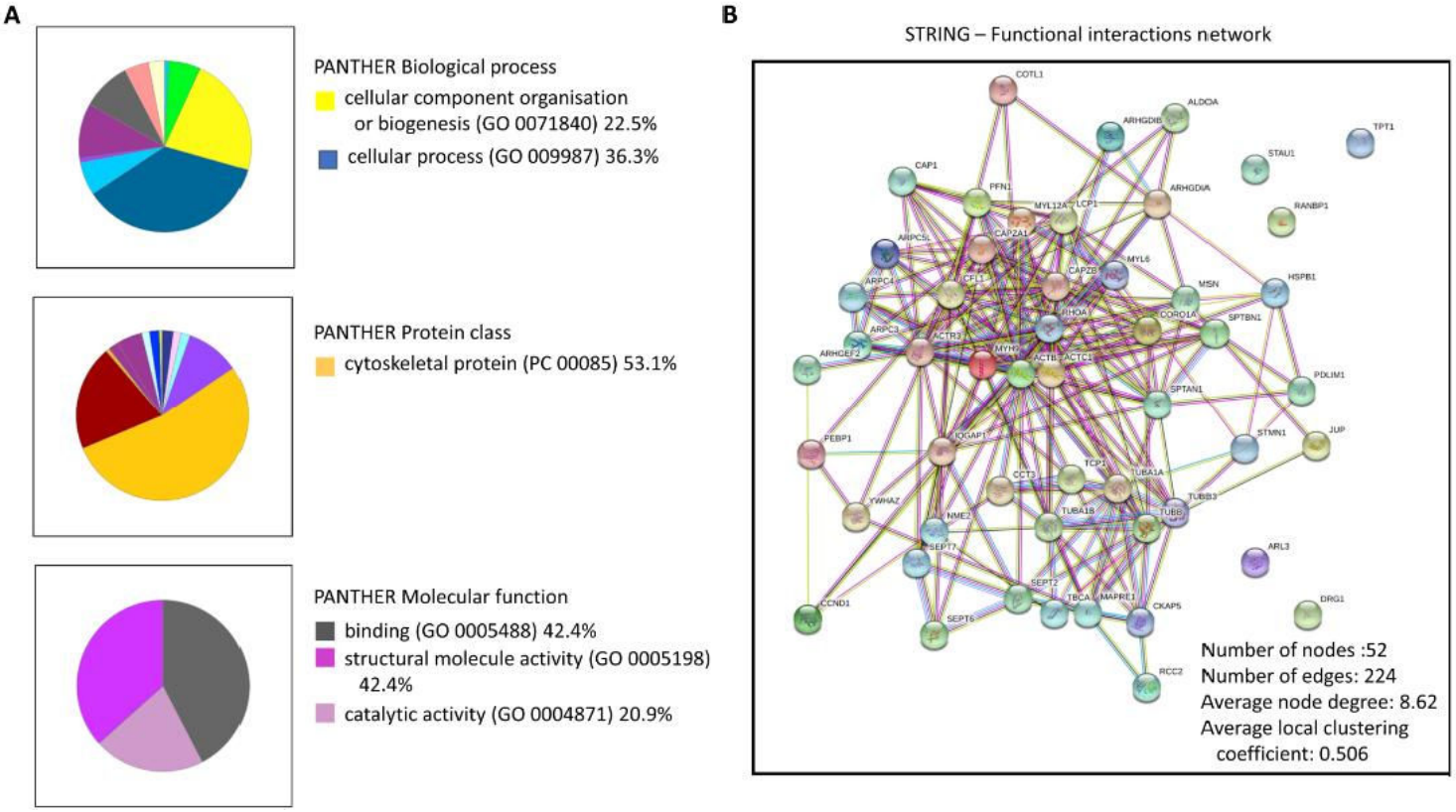

A
PANTHER Biological process
cellular component organisation or biogenesis (GO 0071840) 22.5%
cellular process (GO 009987) 36.3%
PANTHER Protein class
cytoskeletal protein (PC 00085) 53.1%
PANTHER Molecular function
binding (GO 0005488) 42.4%
structural molecule activity (GO 0005198) 42.4%
catalytic activity (GO 0004871) 20.9%
B
STRING – Functional interactions network
Number of nodes :52
Number of edges: 224
Average node degree: 8.62
Average local clustering coefficient: 0.506

Fig. 2

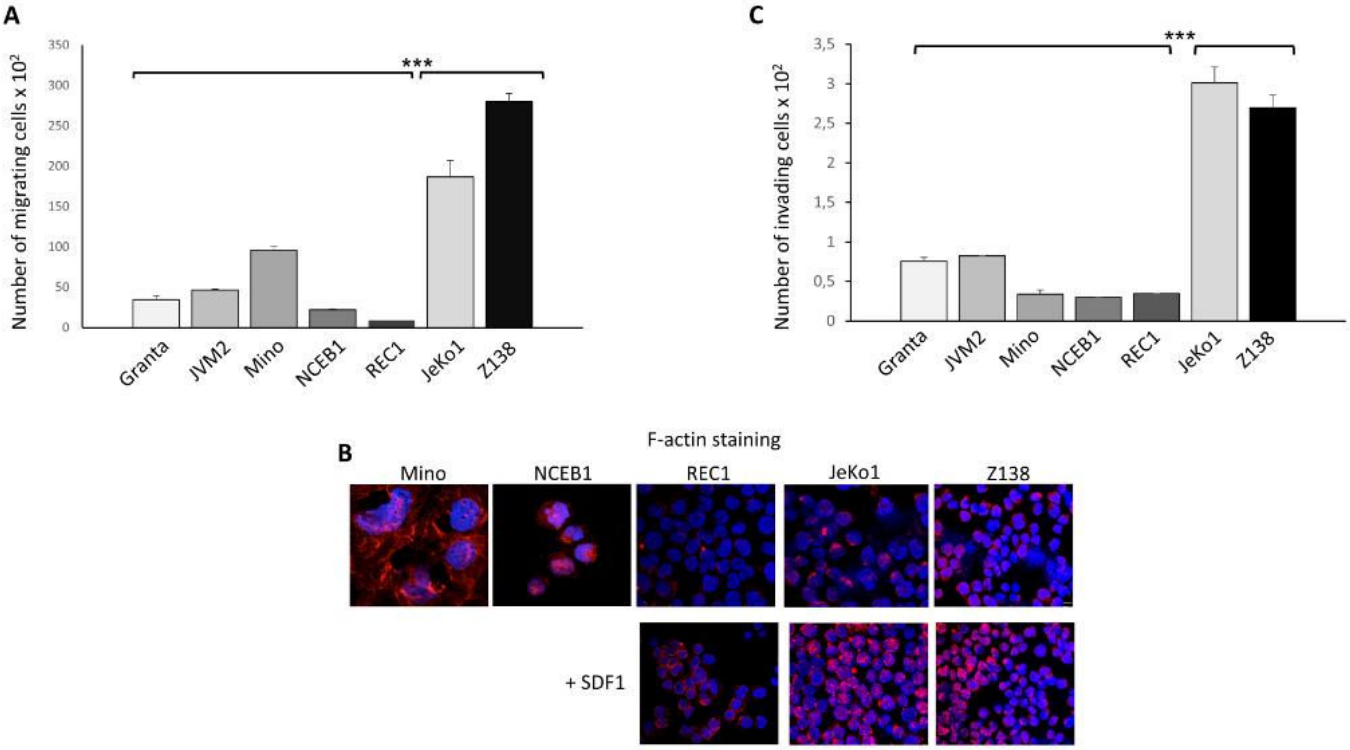

A
Number of migrating cells x 10²
350
300
250
200
150
100
50
0
***
Granta
JVM2
Mino
NCEB1
REC1
JeKo1
Z138
C
Number of invading cells x 10²
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
***
Granta
JVM2
Mino
NCEB1
REC1
JeKo1
Z138
B
F-actin staining
Mino
NCEB1
REC1
JeKo1
Z138
+ SDF1

Fig. 3

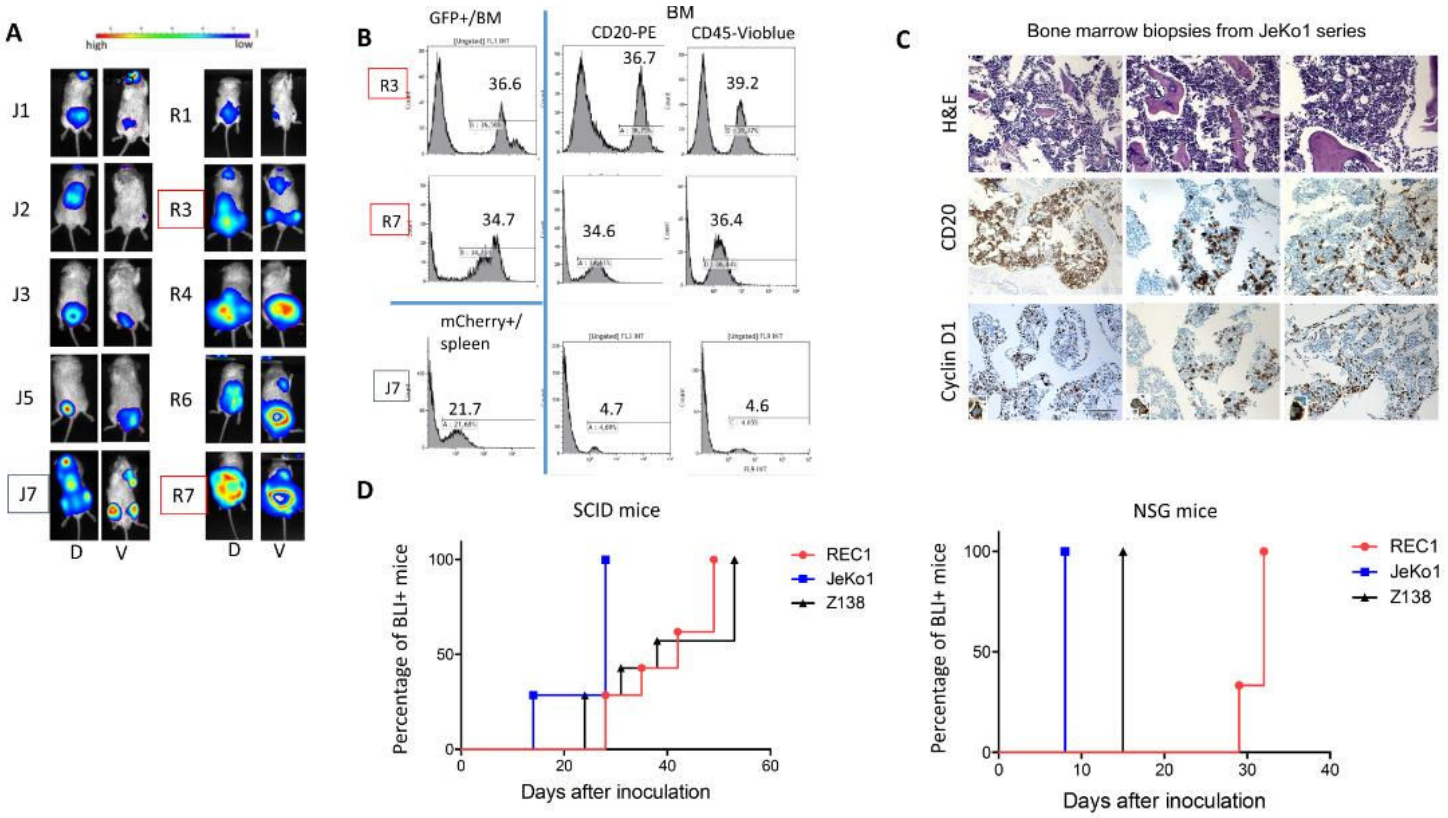

A
high
low
J1
J2
J3
J5
J7
R1
R3
R4
R6
R7
D
V
B
GFP+/BM
BM
CD20-PE
CD45-Vioblue
R3
36.6
36.7
39.2
R7
34.7
34.6
36.4
mCherry+/
spleen
J7
21.7
4.7
4.6
C
Bone marrow biopsies from JeKo1 series
H&E
CD20
Cyclin D1
D
SCID mice
NSG mice
Percentage of BLI+ mice
Days after inoculation
REC1
JeKo1
Z138

Fig. 4

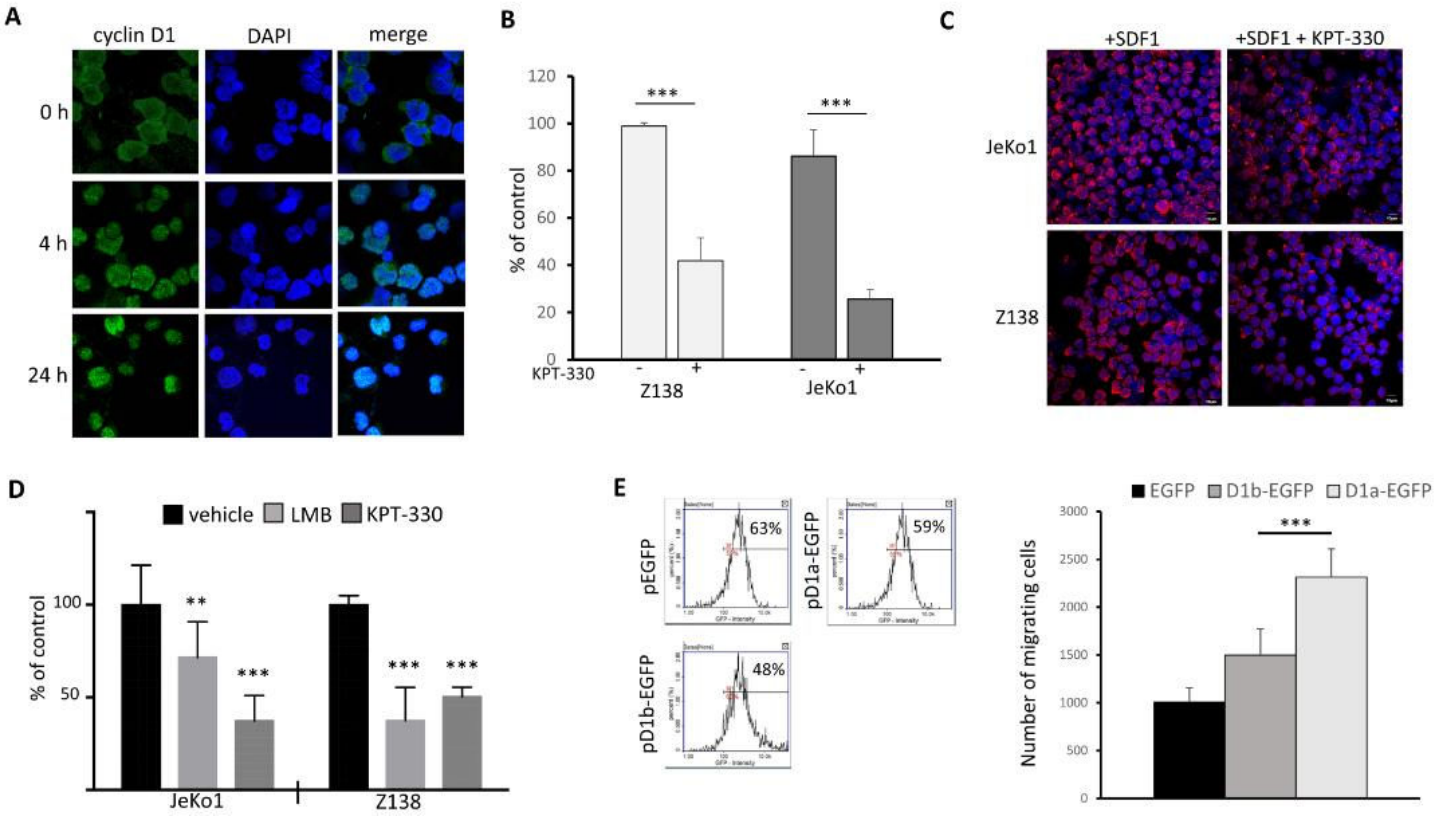

A
cyclin D1
DAPI
merge
0 h
4 h
24 h
B
% of control
120
100
80
60
40
20
0
***
***
KPT-330
-
+
-
+
Z138
JeKo1
C
+SDF1
+SDF1 + KPT-330
JeKo1
Z138
D
vehicle
LMB
KPT-330
% of control
100
50
**
***
***
***
JeKo1
Z138
E
pEGFP
63%
pD1a-EGFP
59%
pD1b-EGFP
48%
EGFP
D1b-EGFP
D1a-EGFP
Number of migrating cells
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
***

Fig. 5

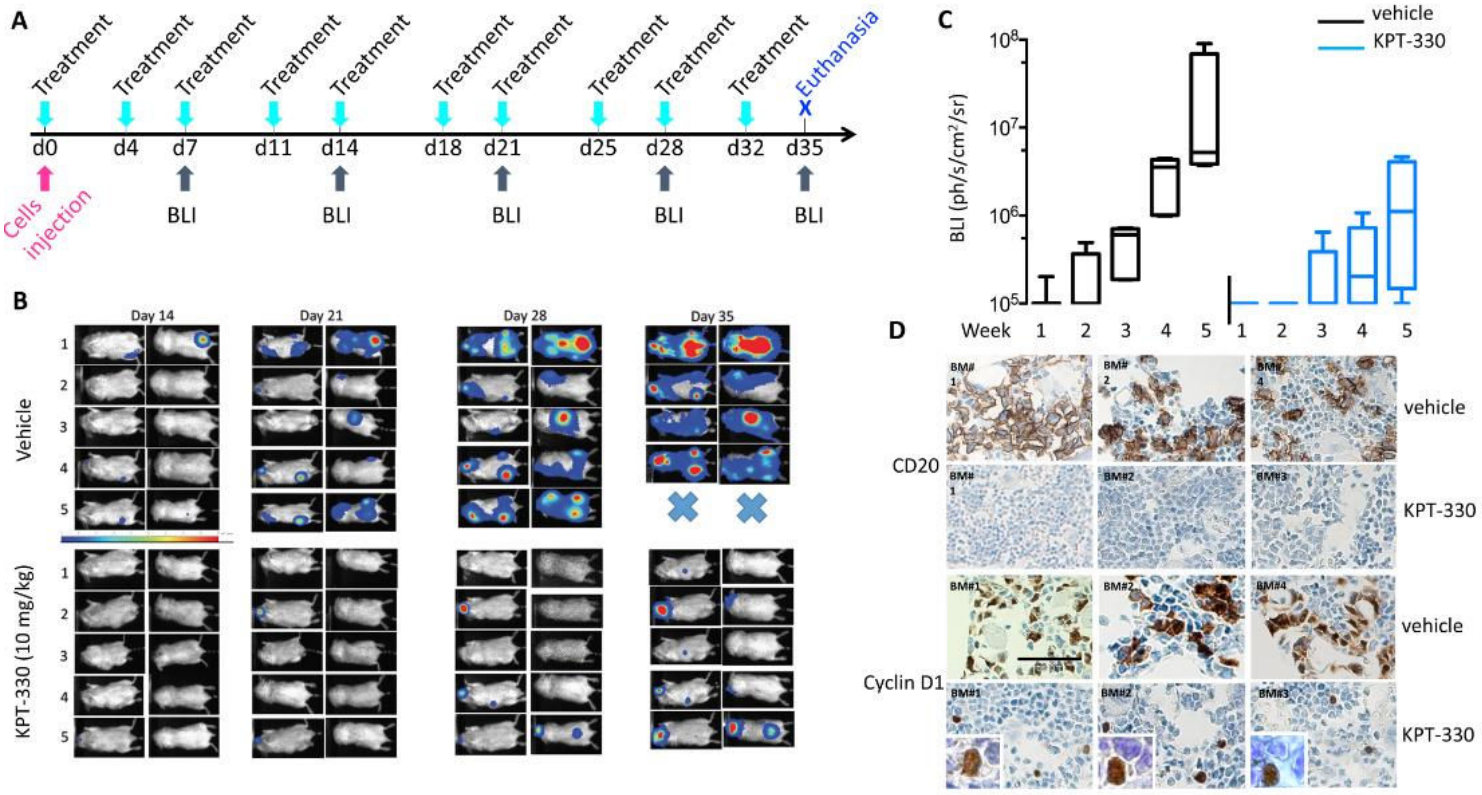

A
Treatment
Euthanasia
d0
d4
d7
d11
d14
d18
d21
d25
d28
d32
d35
Cells injection
BLI
B
Day 14
Day 21
Day 28
Day 35
Vehicle
KPT-330 (10 mg/kg)
C
vehicle
KPT-330
BLI (ph/s/cm²/sr)
Week
D
CD20
Cyclin D1
vehicle
KPT-330

Fig. 6

D. Une diminution de l'activité du protéasome 26S est responsable de la résistance aux stress génotoxiques

L'apparition de clones résistant aux chimiothérapies est la principale cause de rechute des patients atteint d'un LCM. Afin de mieux comprendre ces phénomènes de résistance, nous avons étudié la réponse d'un panel de lignées cellulaires de LCM à un stress génotoxique provoqué par l'étoposide. Nous avons identifié différents profils de réponse et en particulier, la lignée REC1 est particulièrement résistante. Cette résistance est associée à l'absence de dégradation de 3 protéines oncogènes majeures : cycline D1, MCL1 et CDC25A. L'absence de dégradation de ces 3 protéines font que REC1 ne rentre ni en apoptose ni en sénescence suite à un stress génotoxique et qu'au contraire les cellules poursuivent leur progression dans le cycle cellulaire en se divisant. En analysant l'ensemble du processus de dégradation de cycline D1, de son export nucléaire jusqu'à sa prise en charge par le protéasome en passant par son ubiquination, nous avons observé que l'activité du protéasome 26S était diminuée dans cette lignée et plus particulièrement la sous-unité 20S portant l'activité catalytique *trypsin-like*.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans un article original, publié dans la revue BMC Cancer en 2017.

Ben Younes et al. BMC Cancer (2017) 17:538
DOI 10.1186/s12885-017-3530-z

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

A lowered 26S proteasome activity correlates with mantle lymphoma cell lines resistance to genotoxic stress

Khaoula Ben Younes[1,2], Simon Body[1], Élodie Costé[1], Pierre-Julien Viailly[1,3], Hadjer Miloudi[1], Clémence Coudre[1], Fabrice Jardin[1,3], Fatma Ben Aissa-Fennira[2] and Brigitte Sola[1,4*]

Abstract

Background: Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell hemopathy characterized by the t(11;14) translocation and the aberrant overexpression of cyclin D1. This results in an unrestrained cell proliferation. Other genetic alterations are common in MCL cells such as SOX11 expression, mutations of *ATM* and/or *TP53* genes, activation of the NF-κB signaling pathway and NOTCH receptors. These alterations lead to the deregulation of the apoptotic machinery and resistance to drugs. We observed that among a panel of MCL cell lines, REC1 cells were resistant towards genotoxic stress. We studied the molecular basis of this resistance.

Methods: We analyzed the cell response regarding apoptosis, senescence, cell cycle arrest, DNA damage response and finally the 26S proteasome activity following a genotoxic treatment that causes double strand DNA breaks.

Results: MCL cell lines displayed various sensitivity/resistance towards genotoxic stress and, in particular, REC1 cells did not enter apoptosis or senescence after an etoposide treatment. Moreover, the G2/M cell cycle checkpoint was deficient in REC1 cells. We observed that three main actors of apoptosis, senescence and cell cycle regulation (cyclin D1, MCL1 and CDC25A) failed to be degraded by the proteasome machinery in REC1 cells. We ruled out a default of the βTrCP E3-ubiquitine ligase but detected a lowered 26S proteasome activity in REC1 cells compared to other cell lines.

Conclusion: The resistance of MCL cells to genotoxic stress correlates with a low 26S proteasome activity. This could represent a relevant biomarker for a subtype of MCL patients with a poor response to therapies and a high risk of relapse.

Keywords: B-cell lymphoma, Apoptosis, Cell cycle, Senescence, Resistance/sensitivity, Double-strand break, DNA repair, Ubiquitin ligase, 26S proteasome, PSMB6

Background

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoid malignancy derived from mature B cells, characterized by a rapid clinical evolution and a poor response to current therapies [1]. The first oncogenic hit for tumor development is the translocation t(11;14)(q13;q32) which juxtaposes activating sequences from the *IGH* gene promoter upstream of the *CCND1* gene. This translocation leads to the constant expression of cyclin D1 protein and in turn, abnormalities of cell cycle, and compromises the G1-S checkpoint [1]. This initial oncogenic event is followed by various chromosomal alterations targeting DNA damage response (DDR), survival pathways, NOTCH and NF-κB pathways, and chromatin modification machinery [2] as well as reprograming metabolism [3].

ATM (Ataxia telangectasia mutant) and ATR (ATM and Rad3-related) act as apical kinases and key regulators of DDR. Following double-strand DNA breaks (DSBs), ATM/ATR phosphorylate downstream effectors including checkpoint kinases (CHK1/CHK2), DNA repairing factors and transcriptional regulators such as p53 [4]. Next, depending on the cellular context, cells initiate cell cycle arrest, DNA repair through two main mechanisms: homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ), and/or apoptosis. *ATM*

* Correspondence: brigitte.sola@unicaen.fr
[1]Normandie Univ, INSERM UMR 1245, UNIROUEN, UNICAEN, Caen, France
[4]MICAH, UFR Santé, CHU Côte de Nacre, 14032 Caen Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

alterations are very common in MCL patients, mutations and deletions occurring in up to half of cases [5]. Genetic alterations of *TP53* are also very common (30% of cases) and concurrent alterations of *ATM* and *TP53* are found in almost 10% of patients [6]. Defaults in responding intracellular and extracellular genotoxic stresses could explain why MCL is the B-cell malignancy with the highest degree of genomic instability [7].

Abnormalities of the ubiquitin-proteasome pathway are also recognized in MCL cells. They could account for defaults in the DDR and resistance towards genotoxic drugs that are used in clinics such as cyclophosphamide, doxorubicin and chlorambucil [8]. For example, MCL cells show frequent deletion within the *FBXO25* gene located at 8p23.3 [9]. *FBXO25* encodes a F-box containing protein, part of the Skp1/Cullin/F-box containing protein or SCF^{FBXO25} complex that targets the prosurvival HAX1 mitochondrial protein. The monoallelic loss of *FBXO25* and thus, the disruption of the PRKCD (a protein kinase C)/FBXO25/HAX1 axis promotes survival of MCL cells. A high percentage of MCL tumors (20%) have mutations within the *UBR5* gene [10]. UBR5 encodes an E3 ubiquitin ligase that targets KATNA1 (katanin p60), TOPBP1 (DNA topoisomease 2-binding protein 1) and PAIP2 (polyadenylate-binding protein-interacting protein 2) proteins whose functions are not fully known. The human double minute(HDM)-2 E3 ubiquitin ligase plays a key role in p53 turnover. The gene is located within the 12q13 locus which is amplified in MCL [11]. This accounts for elevated HDM2 expression and prevention of both p53 transcriptional activity and degradation. Thus, the response of MCL cells to DNA damaging agents is impaired through various mechanisms.

Studying a set of MCL cell lines, we noticed that REC1 cells were particularly resistant to genotoxic stresses. Looking for cellular mechanisms that could sustain this resistance, we observed that the ubiquitin/proteasome degradation pathway was inefficient. We ruled out a default of β-transducin repeat containing protein (βTrCP), the E3 ubiquitin ligase of the $SCF^{\beta TrCP}$ complex which was a good candidate. We further used fluorescent probes to study specifically the 26S proteasome activity and observed that this activity was specifically down-regulated in REC1 cells compared to other MCL cell lines.

Methods

Cell cultures, treatments and cell proliferation determination

MCL cell lines were provided by Gaël Roué (IDIBAPS, Barcelona, Spain) except Granta519 cells which were purchased from DSMZ (ACC-342). MCL cell lines were maintained in culture as described [12]. Cell authentication was done by STR profiling (IdentiCell, Aarhus, Denmark). Cell proliferation was analyzed using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega, Charbonnières, France) according to the supplier. MCL cells were treated with vehicle (0.01% DMSO) or 1–40 μg/ml etoposide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 24–72 h depending on the experiment. For co-treatment with MG132, the cells were incubated with 5 μM MG132 (Sigma-Aldrich) together with 4 μg/ml etoposide for 24 h.

Quantification of apoptotic and senescent cells, cell cycle analysis

MCL cells exposed to vehicle or etoposide were stained with an Apo 2.7 PE-conjugated antibody (Ab, Beckman Coulter, Villepinte, France). The APO2.7-stained cells were analyzed by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter) and data were processed with the Kaluza software (Beckman Coulter). At least, 2×10^4 cells were analyzed for each culture condition, for each experiment.

For cell cycle experiments, the cells were washed with PBS and fixed in 70% ethanol/PBS at −20 °C for 30 min. After washing, the cells were then incubated with PBS containing 10 mg/ml of propidium iodide (PI) and 100 mg/ml of RNAse A. At least, 2×10^4 cells were analyzed by flow cytometry for each experimental condition.

To assess the presence of senescent cells after etoposide treatment (4 μg/ml for 24 h), we used a cytometry-based assay after staining of living cells with 5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside (C_{12}FDG) as described previously [13]. A shift of the mean fluorescence intensity (MFI) is representative of an enrichment of senescent cells in the whole population.

Indirect immunofluorescence and confocal fluorescence microscopy analysis

Cells (10^5 cells per spot) were cytospun on Superfrost glass slides, at 500 x g for 3 min, then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, and permeabilized by incubation with 0.5% Triton-X100 (*v*/v) for 5 min. The slides were then incubated with 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature and, next with Abs anti-γH2AX (p-S139, final dilution 1/2000) (GTX61796 from GeneTex Inc., Irvine, CA) or anti-cyclin D1 (sc-718, Santa Cruz Tech., final dilution 1/50) for overnight in the dark at 4 °C. Goat anti-rabbit IgG (H + L) polyclonal Alexa Fluor® 546 (Life Technologies) served as secondary Ab. Following staining steps, cells were mounted with VECTASHIELD® with DAPI (Vector Lab.). The slides were analyzed with the Fluoview FV 1000 confocal microscope and Fluoview Viewer software (Olympus, Rungis, France).

Western blotting

Whole cell lysates and western blotting were prepared as previously described [12]. Using the Cell Fractionation Kit (#9038, Cell Signaling Tech.), we separated cells into

cytoplasmic (c), membrane/organelle (m), and nuclear/cytoskeletal (n) fractions and prepared the corresponding protein extracts according to the manufacturer's instructions. We used primary Abs against β-actin (sc-47,778, final dilution 1/1000), cyclin D1 (sc-718, final dilution 1/400), cyclin D2 (sc-593, final dilution 1/200), p53 (sc-126, final dilution 1/400), $p16^{INK4A}$ (sc-468, final dilution 1/100), and $p21^{CIP1}$ (sc-397, final dilution 1/400) from Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA). We purchased Abs against MCL1 (#4572, final dilution 1/500), p-T256-cyclin D1 (#3300, final dilution 1/1000), CHK2 (#6334, final dilution 1/200), p-T68-CHK2 (#2197, final dilution 1/1000), p-S15-p53 (#9286, final dilution 1/1000), βTrCP1 ((#4394, final dilution 1/1000) from Cell Signaling Tech. (Danvers, MA). An Ab against BCL2 (clone 124, M0887, final dilution 1/200) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark); an Ab against γH2AX (GTX61796, final dilution 1/1000) from Genetex (Irvine, CA); an Ab against GAPDH (clone 6C5, final dilution 1/2000) from Ambion (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). We used ImmunoPure goat anti-rabbit or rabbit anti-mouse IgG peroxidase-conjugated as secondary Abs (Pierce, Thermo Fisher Scientific). For densitometric analyses, images were captured with a ChemiDoc™ XRS+ molecular imager and analyzed using Image Lab™ software (Bio-Rad). The background of each image was subtracted from the bands of interest, then the densities of each protein of interest were normalized against the density of control housekeeping proteins.

Proteasome function assays

Our procedure was adapted from Vlashi et al. [14]. Cells were washed with PBS, pelleted and lysed in a homogenization buffer (25 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM ATP, 0.2% (vol/vol) NP-40 and 20% glycerol). Cell debris were removed by centrifugation at 4 °C. Protein concentration in the resulting crude cellular extracts was determined. To measure 26S proteasome activity, 100 μg of protein of each sample were diluted with buffer I (50 mM Tris pH 7.4, 2 mM dithiothreitol, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP) to a final volume of 1 ml and assayed in triplicate. The fluorogenic proteasome substrates Suc-LLVY-AMC (chymotryptic substrate; Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), Z-ARR-AMC (tryptic substrate; Calbiochem, Molsheim, France), and Z-LLE-AMC (caspase-like substrate; Enzo Life Sci.) were dissolved in DMSO and added to a final concentration of 80 μM. Proteolytic activities were continuously monitored for 120 min by measuring the release of the fluorescent group, 7-amido-4-methylcoumarin (AMC), with the use of a fluorescence plate reader (VICTOR X4 multilabel plate reader, Perkin Elmer) at 37 °C, at excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively. For analyzing the effects of proteasome/protease inhibitors on proteasome activities, cells were treated for 4 h with MG-132 (500 nM), bortezomib (5 nM) or leupeptin (20 μM) before the purification of whole cell extracts.

RNA extraction and real-time polymerase chain reaction

Total RNAs were extracted using RNAeasy® Mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions and quantified using a Smartspec™ 3000 spectrometer (Bio-Rad, Hercules, CA) from cultured MCL cells. cDNAs were synthesized using 2 μg of RNA and M-MuLV-reverse transcriptase as recommended by the supplier (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). SYBR Green real-time polymerase chain reaction (RT-PCR, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) was performed on cDNAs with primers for *BTRC* and *FBXW11* previously described [15], using a StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems). Data were analyzed with the Step One software V2.2.2 (Applied Biosystems). Gene expression was determined by real-time RT-PCR and quantified using *GAPDH* expression as internal standard. Relative gene expression was evaluated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

The Student's *t*-test was used to determine the significance of differences between two experimental groups. Data were analyzed by two-sided tests, with $p < 0.05$ (*) considered to be significant.

Results

MCL cell lines demonstrate differences in sensitivity to genotoxic agents

Etoposide, an inhibitor of topoisomerase 2 (Top 2), induces DSBs and triggers apoptosis. The response of five MCL cell lines (Granta519, Mino, REC1, NCEB1 and JeKo1) to etoposide was determined by a MTS cell proliferation assay. Cell lines were either exposed to vehicle or 1 μg/ml etoposide for 24–72 h or increasing concentrations of etoposide (1–40 μg/ml) for 24 h. Etoposide-treatment led to a dose- and time-dependent inhibition of proliferation (Fig. 1A). However, MCL cells displayed various sensitivities and in particular, REC1 and NCEB1 were more resistant than JEKO1, Mino and Granta519 cells (p-value = 0.0134 with the *t*-test). Using the PRISM 6 software, we analyzed the MTS data and calculated the IC_{50} and the area under the curve (AUC) for each cell line, for each treatment condition (Additional file 1: Figure S1). The gradient of sensitivity/resistance among the cell lines was confirmed (Additional file 2: Tables S1 and S2). We next selected three cell lines: REC1 (etoposide-resistant), NCEB1 (intermediate response) and JeKo1 (etoposide-sensitive) for studying the molecular basis of these responses.

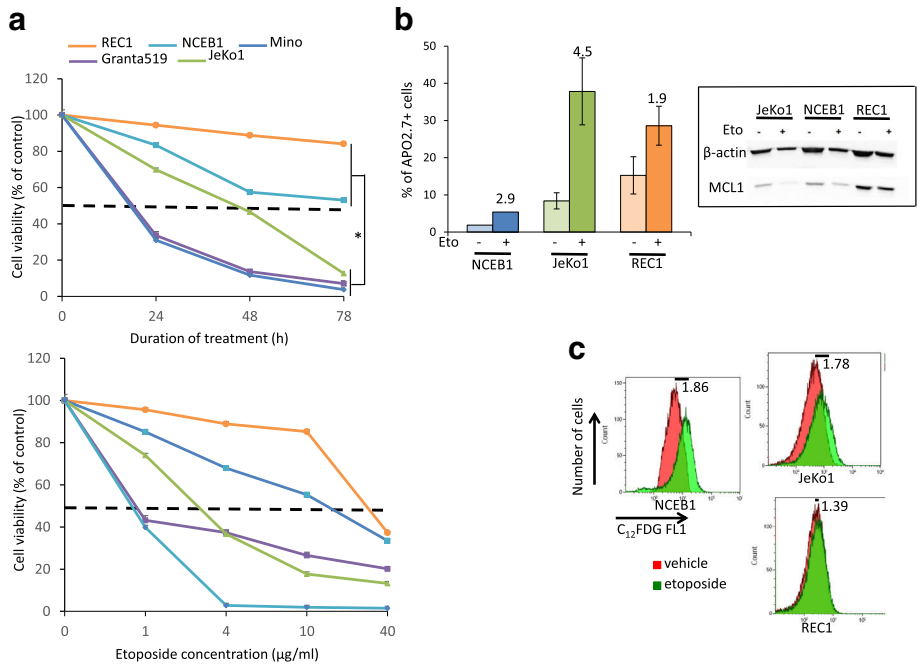


Fig. 1 MCL cell lines are either sensitive or resistant to etoposide treatment. **a**. Exponentially growing Granta519, JeKo1, MINO, NCEB1 and REC1 cells were seeded at 5×10^4 cells/well in 96-well plates and treated with vehicle, as a control, or 1 µg/ml etoposide for 24–72 h (upper panel) or with various concentrations of etoposide (1–40 µg/ml) for 24 h (lower panel). The cell proliferation was analyzed using an MTS assay and calculated as the ratio of absorbance of etoposide-treated cells vs. vehicle-treated cells for each time point and concentration. The absorbance values at 492 nm were corrected by subtracting the average absorbance from the control wells containing "no cells". The experiment was performed twice, each culture condition was done in triplicate. The comparison of sensitive (Granta519, MINO and JeKo1) and resistant (REC1, NCEB1) using the *t*-test was significant. *, $p < 0.05$. **b**. Left part, MCL cells were treated with vehicle or 4 µg/ml etoposide for 24 h, stained with an anti-APO2.7 PE-conjugated Ab and analyzed by flow cytometry. The experiment was performed twice (for NCEB1) or three times; at least 10,000 events were gated for each culture condition. Means ± SD of % of APO2.7+ cells are indicated in the histogram as well as the fold induction (FI) calculated as the ratio of % APO2.7+ in etoposide- vs. vehicle-treated cultures. Right part, whole cell proteins were extracted, 40 µg of proteins were loaded on gels, separated by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes, incubated with Abs anti-MCL1, anti-BCL2 or anti-β-actin (as a loading control). **c**. MCL cells were treated with 4 µg/ml etoposide for 24 h or vehicle, as a control, then stained with C_{12}FDG and analyzed by flow cytometry. At least 10,000 events were gated for each culture condition. The ratio mean of fluorescence intensity of vehicle vs. etoposide-treated cells is indicated on the figure

REC1 cells do not enter apoptosis or senescence after genotoxic stress

We analyzed the effects of etoposide on the induction of cell apoptosis. MCL cells were treated with 4 µg/ml etoposide for 24 h and apoptosis assayed after APO2.7 staining and flow cytometry analysis. Although JeKo1 cells underwent apoptosis (fold induction (FI) = 4.5), NCEB1 and REC1 cells did not show a similar magnitude (FI = 2.9 and 1.9, respectively) (Fig. 1B). In agreement with this observation, the level of MCL1 was gradually downregulated in MCL cells. The extent of downregulation was estimated by densitometry imaging and correlated with the amplitude of apoptotic response (Additional file 2: Table S3). MCL1 protein degradation is mandatory for MCL cell death [16]. In turn, the resistance of REC1 to genotoxic stress could be due to a defect of MCL1 degradation.

Following DNA damage, DDR is coordinated by ATM and ATR that phosphorylate multiple downstream targets and lead finally to cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis [17]. DNA damage could also trigger an irreversible arrest of cell proliferation known as senescence [18]. We used C_{12}FDG, a membrane-permeable molecule that stains senescent cells [13] for analyzing cell response after etoposide treatment. The number of C_{12}FDG-stained NCEB1 and JeKo1 but not REC1 cells increased after treatment (Fig. 1C). To induce the long-term cell cycle arrest that accompanies senescence, two cell cycle inhibitors need to be up-regulated, $p21^{CIP1}$ and $p16^{INK4A}$. The level of both proteins was enhanced in etoposide-treated NCEB1 but not in REC1 cells (data not shown). These results showed that REC1 cells escaped both senescence and apoptosis following genotoxic stress.

Etoposide activates DDR in MCL cells

The resistance of REC1 cells to genotoxic stress could be due to alterations of DDR pathway. DSBs activate ATM/ATR kinases which leads to the phosphorylation of histone H2AX on Ser139 residues and generates γH2AX [19]. ATM/ATR apical kinases activate also DNA damage checkpoints to arrest cell cycle progression for repairing DNA [20]. We first evaluated the extent of DSBs generated following genotoxic

stress. Immunocytofluorescence (ICF) analyses were performed after a 24-h treatment with 4 μg/ml etoposide. DSBs were absent in vehicle-treated NCEB1 and JeKo1 cells, and induced by etoposide-treatment (Fig. 2a). In contrast, vehicle-treated as well as untreated REC1 cells presented γH2AX foci representative of ongoing DNA damage (Fig. 2a, b and Fig. 3e). We next examined the kinetics of γH2AX generation in cells treated with 4 μg/ml etoposide by western blotting. γH2AX foci present in vehicle-treated REC1 cells progressed not much after etoposide treatment (Fig. 2b). In NCEB1 and JeKo1 cells, the level of γH2AX protein increased until 6 h then decreased indicating that DSBs were indeed repaired (Fig. 2b). This result showed that HR and/or NHEJ mechanisms of DNA repair were fully functional in NCEB1 and JeKo1 cells. However, according to Williamson et al. [21], NCEB1 and JeKo1 cells are *TP53*-mutated (Additional file 2: Table S4 and Fig. 2c) and in turn, unable to repair all DNA breaks driving cells to death. Interestingly, apoptosis induced in these responsive cells is p53-independent. DSBs were also able to activate CHK2 as observed by the phosphorylated state of the protein in REC1 cells (Fig. 2c). In that case, as shown both by the presence of γH2AX foci before any genotoxic treatment and after (Fig. 2a, b and Fig. 3e), and the phosphorylation of CHK2 (Fig. 2d), no DNA repair occurred. We concluded that DDR was activated in MCL cell lines including REC1 cells. However, DNA repair mechanisms were inefficient or incomplete in REC1 cells.

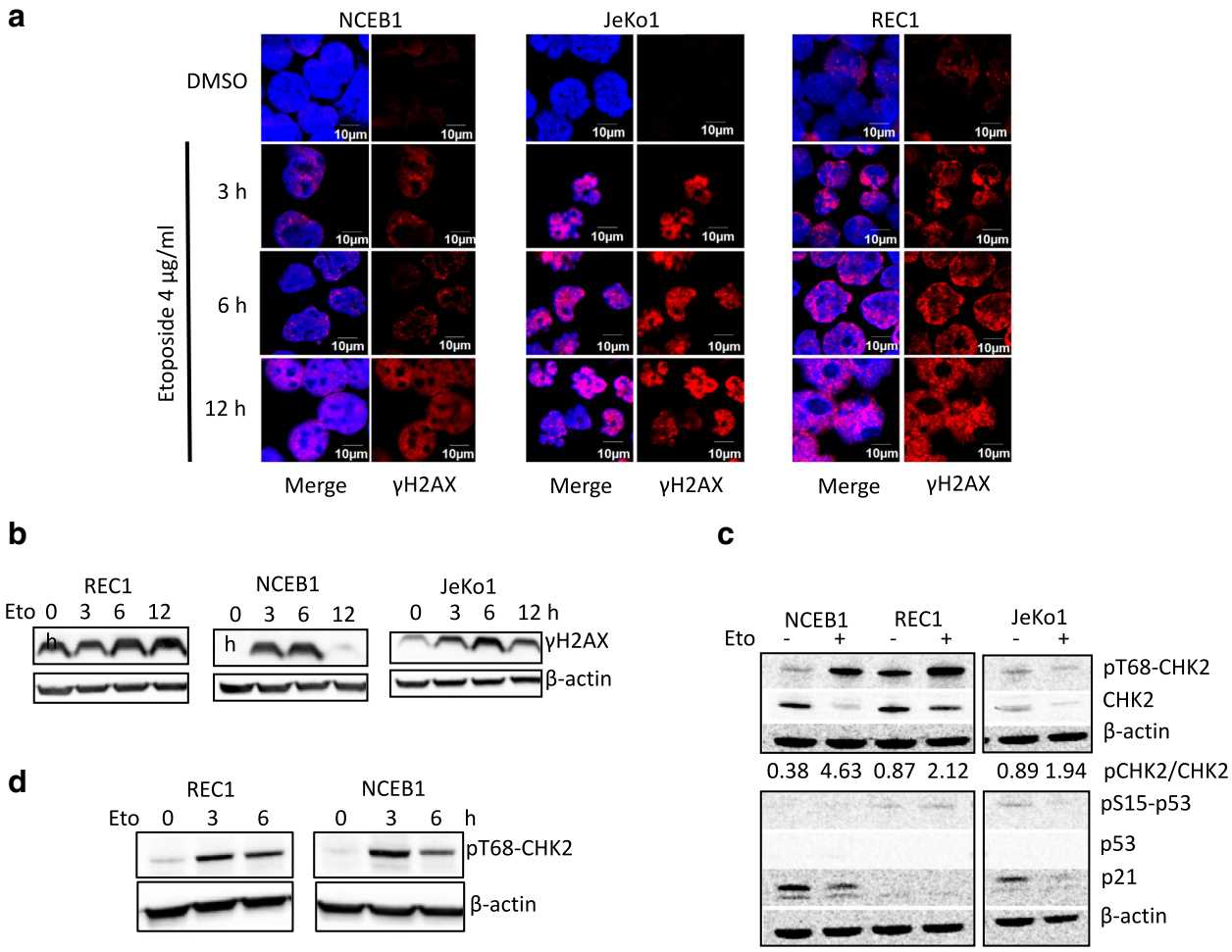


Fig. 2 Etoposide activates DDR in MCL cells. **a**. NCEB1, JeKo1 and REC1 cells were treated with etoposide (4 μg/ml) or DMSO, as a control, and harvested 3, 6 or 12 h later. Cells were then processed for ICF with anti-γH2AX Ab, counterstained with DAPI and analyzed by confocal microscopy. **b**. MCL cells were treated with etoposide (4 μg/ml) or vehicle (0). Whole cell proteins were purified, 40 μg of proteins were loaded on gels, separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and incubated with anti-γH2AX Ab. An anti-β-actin Ab served as a control for gel loading and transfer. **c**. MCL cells were treated with 4 μg/ml etoposide for 24 h and harvested. Western blots were performed as in B. Membranes were incubated with Abs anti-pT68-CHK2, –CHK2 and -β-actin (upper part). The density of specific bands was measured by densitometry and the ratio pCHK2/CKH2 indicated under the blots. Lower part, membranes were incubated with anti-pS15-p53, –p53, –p21 and -β-actin Abs as already described. **d**. Cultured REC1 and NCEB1 cells were treated as in b and western blots were done as described using Abs anti-pT68-CHK2 and -β-actin

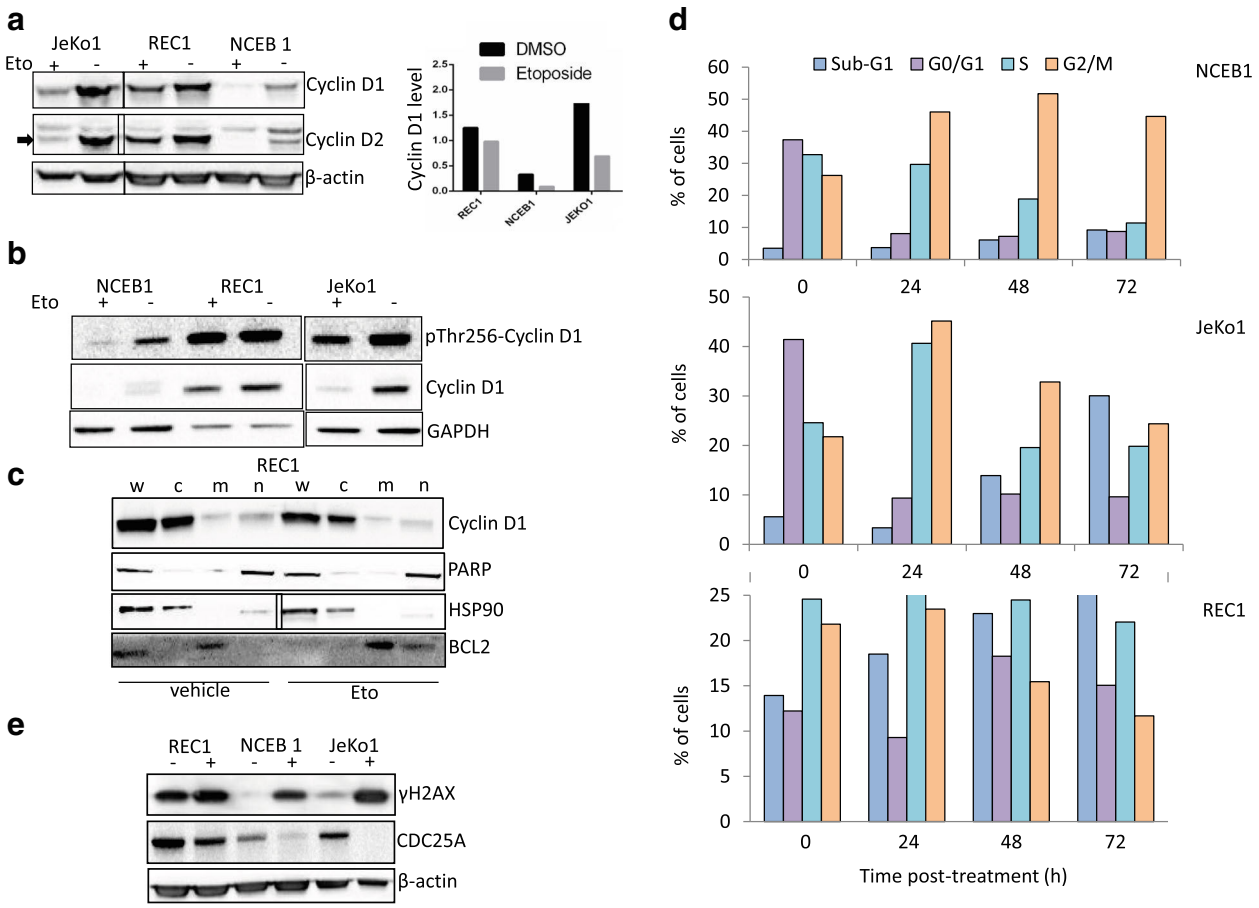


Fig. 3 Cyclin D1 accumulates after genotoxic stress in REC1 cells. **a**. JeKo1, REC1, NCEB1 cells were treated with 4 μg/ml etoposide for 24 h or vehicle, as a control, and harvested. Western blots were performed as described in the legend of Fig. 2 using Abs anti-cyclin D1, –cyclin D2 and -β-actin Abs. The anti-cyclin D2 Ab detects also cyclin D1, the specific cyclin D2 band is arrowed on the figure. The level of cyclin D1 in vehicle and etoposide conditions was estimated by densitometry and reported on the graph. **b**. Cells were cultured and treated as before and analyzed by western blot with the indicated Abs. Anti-GAPDH Ab served as a control for gel loading and transfer. **c**. REC1 cells were treated with 4 μg/ml etoposide for 24 h or vehicle, as a control, and harvested. We purified proteins either from whole cell extracts (w), or from cytoplasm (c), membranes (m) and nucleus (n) compartments. After SDS-PAGE separation and membrane transfer, blots were incubated with an anti-cyclin D1 Ab. The purity of each fraction was verified with Abs specific for cytosolic protein (HSP90), membrane protein (BCL2) and nuclear protein (PARP). **d**. NCEB1, JeKo1 and REC1 cells were treated with vehicle (0) or 4 μg/ml etoposide for 24–72 h. The cells were stained with PI and analyzed by FACS (Gallios, Beckman Coulter). Data were processed with the Kaluza software (Beckman Coulter). The percentage of cells within each phase of the cell cycle (sub-G1, G0/G1, S and G2/M) is indicated on the histogram. At least, 10^4 events were gated for each cell for each culture condition. The experiment has been carried out twice. **e**. MCL cells were treated with vehicle (–) or 4 μg/ml etoposide for 24 h (+) and harvested. Western blots were done as before with the indicated Abs

Apoptotic response after genotoxic stress necessitates the downregulation of cyclin D1 and a block at the G2/M checkpoint

Accumulation of cyclin D1 is associated with genomic instability trough relicensing of DNA replication origins, DNA re-replication, DSB checkpoint activation [22, 23]. We next analyzed cyclin D1 expression in MCL cell lines treated with 4 μg/ml etoposide for 24 h. We observed a dramatic decrease of cyclin D1 level in JeKo1 and NCEB1 not in REC1 cells (Fig. 3a, upper part). This result was confirmed by densitometry (Fig. 3a, lower part). The downregulation of cyclin D1 was not accompanied by a compensatory upregulation of cyclin D2 (Fig. 3a). To be degraded by the proteasome/ubiquitin pathway, cyclin D1 needs to be phosphorylated (p-) on threonine 286 residue [24]. We then analyzed the phosphorylation status of cyclin D1 in etoposide- (4 μg/ml for 24 h) and vehicle-treated cells. As expected, phosphorylated forms of cyclin D1 were present in MCL cells including REC1 cells; p-cyclin D1 was downregulated as cyclin D1 in NCEB1 and JeKo1 cells following genotoxic insult not in REC1 cells (Fig. 3b). The absence of cyclin D1 degradation does not rely on a default of

phosphorylation nor nuclear export. In REC1 cells, cyclin D1 resided in the cytosolic portion, mitochondrial membranes and nucleus as we reported previously for mature B cells [25]. Cyclin D1 shuttled into the cytosol after generation of DSBs for degradation by the ubiquitin/proteasome system (UPS). After etoposide treatment, we observed no accumulation of cyclin D1 into the nucleus, indicating that nuclear export occurred in REC1 cells ruling out abnormalities of the *XPO1* gene and/or the exportin 1 (Fig. 3c and Additional file 3: Figure S2A). We can speculate that, such as MCL1, cyclin D1 degradation could be mandatory for MCL cells to enter apoptosis and/or senescence. To confirm this point, we used doxorubicin in experimental conditions in which DSBs were generated without triggering apoptosis. Doxorubicin-treated MCL cells (25 nM for 24 h) exhibited activation of DDR (Additional file 3: Figure S2B). Moreover, MCL1, CDC25A, and cyclin D1 proteins were not degraded and, in turn, cells did not undergo apoptosis (Additional file 3: Figure S2B and not shown).

Cyclin D1 governs the cell cycle through the G1-S checkpoint. We analyzed the effects of etoposide treatment (4 μg/ml for 24–72 h) on cell cycle distribution after PI staining and flow cytometry analysis. As soon as 24 h post-treatment, NCEB1 cells were blocked at the G2 phase of the cell cycle and JeKo1 cells at both S and G2 phases (Fig. 3d). This block in the cycle progression was followed by the appearance at 48 and 72 h post-treatment of apoptotic cells (*i.e* cells with a sub-G1 DNA content) according to the magnitude of apoptosis. This cell cycle arrest did not occur in REC1 cells (Fig. 3d). Following genotoxic stress, REC1 cells escaped the G2/M block which precedes apoptosis.

CDC25A phosphatase is an essential regulator of G2/M transition and its degradation in response to DNA damage is critical for cell cycle arrest [26]. After activation of ATM/ATR and phosphorylation of CHK1/2, CDC25A became hyperphosphorylated and thus, degraded through its ubiquitylation. We next analyzed the level of CDC25A in etoposide- (4 μg/ml for 24 h) and vehicle-treated cells. CDC25A was not degraded in response to DNA damage in REC1 cells although the protein disappeared almost totally in NCEB1 and JeKo1 cells (Fig. 3e). In agreement with these results the level of CDC25A was maintained both in JeKo1 and REC1 cells following doxorubicin treatment (Additional file 3: Figure S2B).

Cell response after DNA damage depends on the proteasome-ubiquitin pathway

Collectively, our data suggested that REC1 cells were resistant to etoposide because three main actors of apoptosis, senescence and cell proliferation: cyclin D1, MCL1 and CDC25A failed to be degraded by the proteasome machinery. We verified that the inhibition of proteasome by the MG132 inhibitor allowed cyclin D1, CDC25A, and MCL1 to resist degradation in JeKo1 and NCEB1 cells (Fig. 4a). Furthermore, in JeKo1 cells, a MG132-treatment relieved cell cycle block at the S/G2 transition (Fig. 4b). Cyclin D1, MCL1 and CDC25A are all proteins with a short half-life that are targeted by SCF complexes. Looking for an E3 ubiquitin ligase that could be involved in the ubiquitylation of cyclin D1, MCL1 and CDC25A, we found βTrCP a good candidate. Indeed, if essentially four F-box proteins were shown to contribute to cyclin D1 degradation (FBXO4, FBXW8, SKP2 and FBXO31), βTrCP could allow for cyclin D1 ubiquitylation in some conditions [27] and through an unconventional recognition site, ^{279}EEVDLACpT^{286} [28]. Moreover, βTrCP targets MCL1 for ubiquitylation and destruction [29, 30], and controls the degradation pathway of CDC25A following DNA damage [31]. CReP (constitutive reverter of eIF2α phosphorylation) is a protein phosphatase 1 (PP1) that targets the translation initiation factor eIF2α to promote the removal of stress-induced inhibitory phosphorylation and increase cap-dependent translation. CReP is targeted by βTrCP for degradation upon DNA damage [32]. In good agreement with our previous results, following etoposide treatment (4 μg/ml for 24 h), the phosphorylated form of eIF2α was degraded in JeKo1 cells over time but not in REC1 cells (Fig. 4c).

The response of MCL cells to etoposide is not driven by the βTrCP E3 ligase

Humans have two βTrCP paralogs: βTrCP1 (also known as FBXW1 or BTRC) and βTrCP2 (also known as FBXW11) with indistinguishable biochemical properties. Indeed, they share 86% identical amino acids in the F-box responsible for substrate specificity [33]. The two proteins are encoded by distinct genes localized on 10q24.32 for *BTRC* and 5q35.1 for *FBXW11* [15, 34]. The expression of BTRC and FBXW11 mRNAs was studied by a semi-quantitative RT-PCR in our panel of MCL cell lines (Granta519, JeKo1, JVM2, Mino, NCEB1, REC1 and Z138 cells; Additional file 2: Table S5). The *FBXW11* gene was expressed at a basal low level; by contrast, *BTRC* gene was expressed in all tested cells although with various levels (data not shown). Some commercially available antibodies against βTrCP detect unrelated proteins in western blots [35]. However, we validated an antibody directed against the βTrCP1 protein using Granta519 and MINO cells transiently transfected with pcDNA3-Flag-βTrCP1 and −2 expression plasmids ([26], data not shown). Two forms of βTrCP1 were detected in JeKo1, NCEB1 and REC1 cells. Etoposide treatment had no effects on βTrCP1 level in MCL cells (Fig. 4d). Moreover, the analysis of βTrCP1 level in the panel of MCL cells revealed a heterogeneous expression with no correlation with the magnitude of response towards etoposide (Fig. 4e). These data suggested that βTrCP was not altered in REC1 cells and not involved in cells resistance.

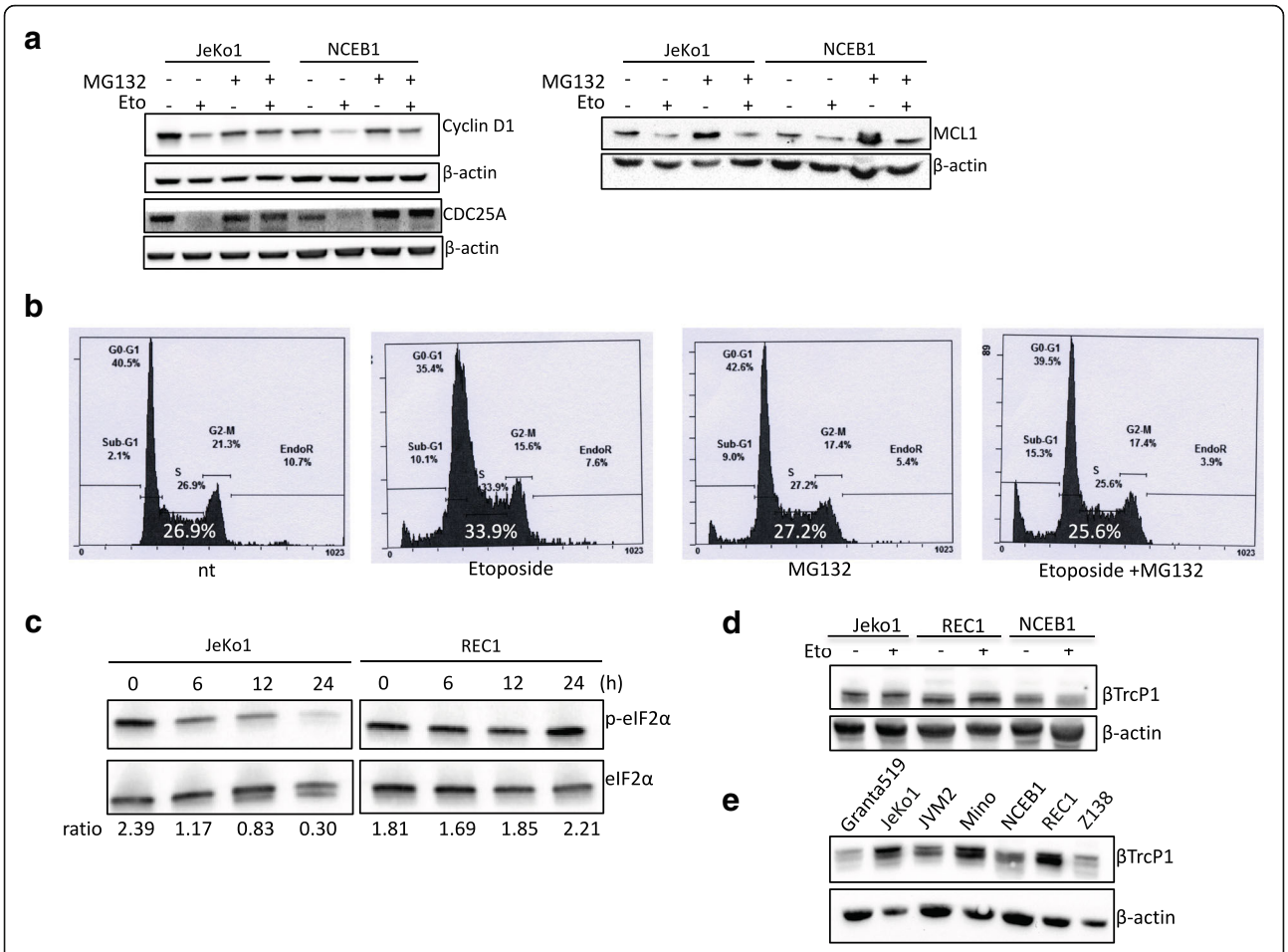


Fig. 4 Cell response depends on the proteasome-ubiquitin pathway. **a**. JeKo1 and NCEB1 cells were treated with 1 μM etoposide, or 5 μM MG132, or both for 24 h, or vehicle, as a control, and harvested. Western blots were performed with the indicated Abs as described in the legend of Fig. 2. **b**. Cells were treated as in a, stained with PI and analyzed by flow cytometry. Cytometry profiles from a representative experiment are shown, the percentage of cells in the S phase is indicated on the graph. **c**. JeKo1 and REC1 cells were treated with 4 μg/ml etoposide (or vehicle, 0) for the indicated periods (6–24 h). Whole cell proteins were purified and analyzed by western blotting with the indicated Abs. The ratio p-eIF2α/ eIF2α estimated by densitometry, is indicated under the blots. **d**. Cells were treated with vehicle (–) or etoposide 4 μg/ml (+) for 24 h, then harvested. Whole cell proteins were purified, separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted with an antibody against βTrcP1 protein. **e**. Proteins were purified from the indicated MCL cell lines and analyzed by western blot as described in d

26S proteasome activity is lowered in REC1 cells

The 26S proteasome is a macromolecular machinery composed of the 20S catalytic core and the 19S regulator [36]. The 20S core complex is shaped as a cylinder formed by a stack of four rings, each ring consisting in seven distinct subunits. The two outer rings are made of the α subunits (α1-α7); they mediate the interaction with the 19S regulatory core. The two inner rings are made of the β subunits (β1-β7); they possess at least three distinct proteolytic activities that can be monitored using specific fluorogenic substrates: Suc-LLVY-AMC, Z-ARR-AMC, and Z-LLE-AMC, respectively. β1, β2 and β5 subunits are referred to as having caspase-, trypsin-, and chymotrypsin-like activities based on their preference for cleaving peptides [36]. We further analyzed the 20S proteasome activity in cell lysates from either non-treated JeKo1 and REC1 cells or following a treatment with various proteasome inhibitors. In all cell extracts, chymotrypsin-, trypsin-, and caspase-like activities increased over time to reach a plateau at 60 min (data not shown). Therefore, we compared cells in various culture conditions at that time. As presented in Fig. 5 (left and right histograms), chymotrypsin and caspase-like activities were similar for JeKo1 and REC1 cells and inhibited by a MG-132 treatment. In agreement with our data, MG-132 binds with a high affinity the β5 site and a lower activity the β1 site of the proteasome [36]. In sharp contrast, the trypsin-like activity of the β2 site in REC1 cells was reduced compared to JeKo1 cells (p = 0.00083229 with the t-test). Whatever the initial activity, it was reduced to the same extent after bortezomib or leupeptin treatments (Fig. 5, middle panel). Bortezomib and leupeptin are both inhibitors of the trypsin-like

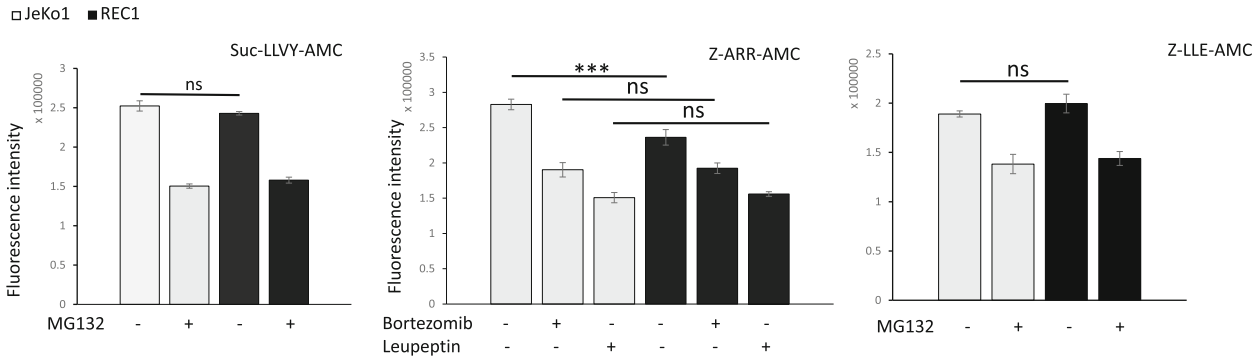


Fig. 5 Proteasome activity is lowered in REC1 cells. JeKo1 and REC1 cells were treated with MG-132 (500 nM), bortezomib (5 nM), or leupeptin (20 μM) for 4 h or vehicle, and protein extracts were prepared. Chymotrypsin-, trypsin- and caspase-like activities were monitored using Suc-LLVY-AMC, Z-ARR-AMC, and Z-LLE-AMC fluorogenic substrates, respectively with a reader plate (Victor X4, Perkin Elmer). For all culture conditions and substrates, the protease activity reached a plateau at 60 min. Fluorescence intensities (in arbitrary unit) were taken at that time and presented in the histograms. The experiments were done three times with triplicate samples. ***, $p < 0.001$ with the *t*-test

activity [36]. These results showed that the trypsin-like activity of the 20S core particle is lowered in REC1 cells compared to JeKo1 cells.

Discussion

Although therapeutic strategies for MCL have evolved these last years, the disease remains largely incurable. MCL patients develop *de novo* resistance or acquire resistance to frontline drugs [37]. There is a great need to overcome resistance in MCL patients and to improve their clinical outcome. This can be achieved through a better knowledge of the mechanisms of resistance. We studied the response of a panel of MCL cell lines to genotoxic stress and observed a heterogeneous response. REC1 cells are the most resistant and JeKo1 cells the most sensitive to etoposide, a Top 2 inhibitor that generates DSBs. We observed that three main actors of cell cycle arrest, senescence and apoptosis, namely cyclin D1, MCL1 and CDC25A that are enrolled after a genotoxic stress, fail to be degraded in response to etoposide. We finally provided evidence for a lowered 26S proteasome activity that could sustain the accumulation of these proteins and in turn, the resistance of MCL cells.

Defective proteolysis have been reported in MCL cells. Indeed, mutations of *CCND1* gene at the N-terminus increases cyclin D1 protein stability through the attenuation of threonine 286 phosphorylation and its nuclear retention [38]. The phosphorylation of cyclin D1 is mandatory for protein degradation by the UPS. We have shown that cyclin D1 is correctly phosphorylated in resistant REC1 cells after etoposide treatment and exported to the cytoplasmic compartment. Although E36K, Y44D, and C47S *CCND1* mutations have not been reported for REC1 cells, we can rule out such a mechanism of resistance. Importantly, in MCL cell lines, *CCND1* mutations promote resistance to ibrutinib, an inhibitor of the Bruton tyrosine kinase (BTK) involved in the B-cell receptor (BCR) signaling pathway. Recent studies have provided some clues about ibrutinib resistance including activation of the NF-κB, ERK1/2 and AKT, alteration of the BCR signaling pathways [39–41]. These studies suggest that multiple mechanisms contribute to ibrutinib resistance. Moreover, a same mechanism, i.e. the accumulation of nuclear cyclin D1, contributes to resistance to several drugs: ibrutinib [38], lenalidomide [12], and etoposide (the present study), drugs that target different pathways. According to these data, an increased stability of cyclin D1 is a major mechanism for MCL cells resistance.

REC1 cells are resistant to proteasome inhibitors: bortezomib (Additional file 3: Figure S2C, upper panel), MG132, and carfilzomib (data not shown)). However, REC1 cells enter apoptosis when treated with KNK-437, an inhibitor of heat-shock factor 1 (HSF1). HSF1 is the master transcription factor for heat shock proteins (HSPs) encoding genes. The inhibition of HSF1 downregulates simultaneously the transcription of *HSPB1* and *HSPA4* coding for HSP27 and HSP70, respectively. Acosta-Alvear and colleagues reported recently that proteostasis factors such as chaperones and HSPs controlled the response to proteasome inhibitors [42]. In particular, the knockdown of HSF1 sensitizes cells to carfilzomib in agreement with our observation. Moreover, the fact that REC1 cells respond to a HSF1 inhibitor suggests that the UPS although downregulated can be rearmed. Moreover, combining HSP inhibitors and proteasome inhibitors could be efficient therapies for MCL patients resistant to bortezomib/carfilzomib. Clinical trials have demonstrated such efficacy for bortezomib associated with several types of HSP90 [43–45] or HSF1 [46–48] inhibitors for multiple myeloma (MM) patients.

REC1 cells are sensitive to sn38, the metabolically active form of irinotecan, an inhibitor of Top 1, (Additional file 3: Figure S2C, lower panel). Importantly, the IC_{50} for sn38 is similar for REC1 and NCEB1 and smaller than JeKo1

cells. sn38 selectively targets Top 1-DNA cleavage complexes which form at the vicinity of replication and transcription complexes to unwind DNA. The stabilization of Top 1-DNA cleavage complexes leads to DNA damage at the time of DNA replication or transcription, and finally to DSBs [49]. DSBs either generated by sn38 or etoposide elicit the same DNA repair response. We showed in this study that DDR was activated in REC1 cells but that DNA repair mechanisms were deficient. This data is confirmed by the triggering of apoptosis after sn38-treatment in REC1 cells, in which the apoptotic machinery is fully functional. There is no cross-resistance in REC1 cells to Top 1 and Top 2 inhibitors. Moreover, the sensitivity/resistance pattern of MCL tumor cells towards drugs is multifactorial and largely dependent on the cell context.

Two studies reported recently a paradoxical resistance of multiple myeloma tumor cells to proteasome inhibitors by decreased levels of 19S proteasome regulatory subunits [42, 50]. These are ATPase subunits as well as non-ATPase subunits and seem specific for a cell line. A down-regulation of 19S sub-units could sustain the global decreased proteasome activity observed in REC1 cells and could be key determinant of resistance to proteasome inhibitors and other drugs in MCL tumor cells. However, the demonstration that the reduced trypsin-like activity bore by the 20S core complex and, in particular, the β2 subunit (or PSMB7), highlights another type of proteasome subunit abnormality. To our knowledge, this is the first report of a putative role of the β2 subunit in a resistance process. In contrast, the involvement of the β5 subunit in the resistance of various hemopathies is well described. For example, in a myelomonocytic THP1 cell line, selected for acquired resistance to bortezomib, the *PSMB5* gene coding for PSMB5, the β5 subunit, is mutated and the corresponding protein overexpressed [51]. In MM tumor cells resistant to bortezomib, no such mutations were found [52], rather a constitutive activation of the STAT3 signaling pathway and in turn, the upregulation of the β5 subunit [53]. However, the *PSMB7* gene coding for β2 subunit is overexpressed in a large variety of solid cancers and myeloid leukemias [54]. A survey of public available data bases (COSMIC, canSAR, Cancer Cell Line Ecyclopedia) indicated that *PSMB5* and *PSMB7* genes are not mutated, deleted nor amplified in REC1 cells. Further experiments should address these points.

Cancer stem cells (CSCs) or cancer-initiating cells (CICs) belong to a population of self-renewing cells that sustain the long-term clonal maintenance of the tumor [55]. Strong evidences support a link between stemness and resistance to drugs. CSCs/CICs have develop plethora of strategies to resist anticancer therapies including elevated activity for DNA damage detection and repair, increased ability for xenobiotic efflux, unbalance between the anti- vs. pro-apoptotic mechanisms, reduced production of free radicals etc. Interestingly, a low proteasome activity has been reported as a marker for breast cancer and head and neck CSCs/CICs [56, 57].

Several recurrent somatic mutations are described in tumor cells of MCL patients [58]. Among them, mutations of *ATM*, *CCND1*, *TP53*, *MLL2*, *TRAF2* and *NOTCH1* genes are frequently encountered and account for resistance to drugs. Most of them target the BCR and NF-κB signaling pathways and define actionable gene targets. However, deletion of *FBXO25* [9], mutation of *UBR5* [10] or, as suggested here, a decreased of global 26S proteasome activity modify the UPS and in turn, the sensitivity to drugs and the clinical response of MCL patients. Since, the resistance to proteasome inhibitor and/or other drugs is convoyed by defaults of UPS, the restoration of its activity seems determinant to bypass resistance and to achieve a full response towards treatments.

Conclusions

MCL patients are either resistant or develop resistance after the treatments with frontline agents. Several mechanisms of resistance have been described in MCL tumor cells that escape apoptosis. We report here that a lowered 29S proteasome activity could be another mechanism of MCL cell resistance. Developing a strategy to counteract this mechanism of resistance may have significant therapeutic value.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. MCL cell lines were treated with vehicle or etoposide (10^{-3}-10^{2} μg/ml) for 24–72 h. Cell viability was assayed using an MTS assay (CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). The absorbance (OD at 490 nM) of each clone treated with the drug is expressed relative to that of the corresponding clone treated with vehicle (defined as 100%). For each set of culture conditions, the mean ± SD of triplicate ratios is indicated on the curves. The experiment was performed twice. The results were analyzed with the PRISM® 6 software and reported in the Tables S1 and S2 in Additional file 1. (PDF 168 kb)

Additional file 2: Table S1. Calculation of IC_{50} for etoposide-treated MCL cell lines. **Table S2.** Calculation of AUC for etoposide-treated MCL cell lines. **Table S3.** MCL1 level is variously regulated following etoposide treatment. **Table S4.** Genetic characteristics of MCL cell lines. **Table S5.** Sequences of the primers used for RT-PCR. Additional references. (DOCX 120 kb)

Additional file 3: Figure S2. A. REC1 cells were treated with vehicle or etoposide 4 μg/ml for 2–24 h and harvested. Cells (10^5 cells per spot) were cytospun on Superfrost glass slides, at 500 g for 3 min, then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized by incubation with 0.5% Triton-X100 (*v/v*) for 5 min. Slides were then stained with rabbit anti-cyclin D1 primary Ab (sc-718, Santa Cruz Biotech.) and AlexaFuor® 546 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) secondary Ab. DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Molecular Probes) served for nuclei counterstaining. Slides were mounted, and analyzed with a Fluoview FV 1000 confocal microscope and Fluoview Viewer software (Olympus). B. Cultured JeKo1 and REC1 cells were treated with vehicle (Ctrl) or doxorubicine (Dox 25 nM) for 24 h. Whole cell proteins were purified, separated by SDS-PAGE, and immunoblotted with the indicated antibodies. An anti-

β-actin served as a control of charge and transfer. C. Cultured JeKo1 and REC1 cells were treated with vehicle (Ctrl) or bortezomib (10^{-1}-10^{4} nM) or sn38 (10^{-1}-10^{3} nM) for 24 h and then cell viability assessed by a MTS assay as described in the legend of the Fig. 1a. Dose-reponse curves were drawn with the PRISM® software (GraphPad, La Jolla, CA) and the IC_{50} were deduced from the data. (PPTX 5260 kb)

Abbreviations
Ab: antibody; ampl: amplified; ATM: ataxia telangectasia mutant; ATR: ATM and Rad3-related; BCL2: B-cell lymphoma 2; BCR: B-cell receptor; BTK: Bruton tyrosine kinase; C_{12}FDG: 5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside; CDC25A: cell division cycle 25 homolog A; cDNA: complementary DNA; CHK1/2: checkpoint kinase 1/2; CIC: Cancer-initiating cell; CReP: constitutive reverter of eIF2α phosphorylation; CSC: cancer stem cell; DDR: DNA damage response; del: deleted; DSB: double-strand break; eIF2α: eukaryotic translation initiation factor 2α; hom: homozygous; HR: homologous recombination; HSP: heat shock protein; ICF: immunocytofluorescence; MCL: mantle cell lymphoma; MCL1: myeloid cell leukaemia sequence 1; MM: multiple myeloma; MTS: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H–tetrazolium); mut: mutated; nd: not determined; NHEJ: non-homologous end-joining; p-: phosphorylated; PI: propidium iodide; PP1: protein phosphatase 1; qRT-PCR: quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction; QVD-OPH: broad spectrum caspase inhibitor; SCF: SKP1/Cullin/F-box protein containing complex; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; Top: topoisomerase; upd: uniparental disomy; UPS: ubiquitin proteasome system; wt: wild-type; βTrCP: β-transducin repeat containing protein

Acknowledgements
We thank Anne Barbaras for technical assistance, Daniele Guardavaccaro (Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands) for the gift of βTrCP1/2 expression plasmids, and Olivier Coqueret (Centre de Recherche en Cancérologie, Angers, France) for the gift of sn38. We are grateful to Véronique Baldin (Centre de Recherche en Biologie Moléculaire, Montpellier, France), Sébastien Léon (Université Paris Diderot, Institut Jacques Monod, Paris, France), Manuel Rodriguez (Institut des Technologies Avancées en Sciences du Vivant, CNRS USR3505, Toulouse, France), Chann Lagadec (Université de Lille 1, INSERM U908, Lille, France) and Hervé Mittre (Laboratoire de génétique, Centre Hospitalo-Universitaire, Caen, France) for helpful discussions, and Gaël Roué (IDIBAPS, Barcelona, Spain) and Arthur Vincent-Coves for reading the manuscript.

Funding
This project has been financially supported in part by the *Ligue contre le Cancer* (*Comité du Calvados*) to BS. The *Ligue contre le Cancer* had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data or in writing the manuscript. KBY received study grants awarded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia.

Availability of data and materials
All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Authors' contributions
KBY, SB, EC, HM, CC, PJV, FJ contributed to data acquisition, analysis, and interpretation; FBF supervised the study; BS designed the study, interpreted the data, supervised the study and wrote the paper. The authors read, revised and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable

Consent for publication
Not applicable

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]Normandie Univ, INSERM UMR 1245, UNIROUEN, UNICAEN, Caen, France. [2]Faculté de médecine, Laboratoire de Génétique, d'Immunologie et de Pathologie humaines, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia. [3]Département d'Hématologie Clinique, Centre de Lutte contre le Cancer Henri Becquerel, Rouen, France. [4]MICAH, UFR Santé, CHU Côte de Nacre, 14032 Caen Cedex, France.

Received: 9 January 2017 Accepted: 3 August 2017
Published online: 10 August 2017

References
1. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. Perspectives for new targeted therapeutics. Nat Rev Cancer. 2007;7:750–62.
2. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. J Clin Invest. 2012;122:3416–23.
3. Yu W, Denu RA, Krautkramer KA, Grindle KM, Yang DT, Asimakopoulos F, et al. Loss of SIRT3 provides growth advantage for B cell malignancies. J Biol Chem. 2016;291:3268–79.
4. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009;461:1071–8.
5. Beà S, Valdés-Mas E, Navarro A, Salaverria I, Martín-Garcia D, Jares P, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:18250–5.
6. Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:2352–7.
7. Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma. Biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. Blood. 2011;117:26–38.
8. Chen R, Sanchez J, Rosen ST. Clinical management updates in mantle cell lymphoma. Oncology. 2016;30:353–60.
9. Baumann U, Fernández-Sáiz V, Rudelius M, Lemeer S, Rad R, Knorn AM, et al. Disruption of the PRKCD-FBXO25-HAX-1 axis attenuates the apoptotic response and drives lymphomagenesis. Nat Med. 2014;20:1401–9.
10. Meissner B, Kridel R, Lim RS, Rogic S, Tse K, Scott DW, et al. The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. Blood. 2013; 121:3161–4.
11. Jones RJ, Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Kuhn DJ, Orlowski RZ. Drug resistance to inhibitors of the human double minute-2 E3 ligase is mediated by point mutations of p53, but can be overcome with the p53 targeting agent RITA. Mol Cancer Ther. 2012;11:2243–53.
12. Moros A, Bustany S, Cahu J, Saborit-Villarroya I, Martínez A, Colomer D, et al. Antitumoral activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphoma involves the destabilization of cyclin D1/p27KIP1 complexes. Clin Cancer Res. 2014;20:393–403.
13. Cahu J, Sola B. A sensitive method to quantify senescent cancer cells. J Vis Exp. 2013; doi:10.3791/50494.
14. Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. J Natl Cancer Inst. 2009;101:350–9.
15. Putters J, Slotman JA, Gerlach JP, Strous GJ. Specificity, location and function of βTrCP isoforms and their splice variants. Cell Signal. 2011;23:641–7.
16. Chen R, Chubb S, Cheng T, Hawtin RE, Gandhi V, Plunkett W. Responses in mantle cell lymphoma cells to SNS-032 depend on the biological context of each cell line. Cancer Res. 2010;70:6587–97.
17. Jekimovs C, Bolderson E, Suraweera A, Adams M, O'Byrne KJ, Richard DJ. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. Front Oncol. 2014;4:86.
18. Lanigan F, Geraghty JG, Bracken AP. Transcriptional regulation of cellular senescence. Oncogene. 2011;30:2901–11.
19. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. Leukemia. 2010;24:679–86.
20. Stracker TH. The ATM signaling network in development and disease. Front Genet. 2013;4:37.
21. Williamson CT, Kubota E, Hamill JD, Klimowicz A, Ye R, Muzik H, et al. Enhanced cytotoxicity of PARP inhibition in mantle cell lymphoma harbouring mutations in both ATM and p53. EMBO Mol Med. 2012;4:515–27.

22. Aggarwal P, Lessie MD, Lin DI, Pontano L, Gladden AB, Nuskey B, et al. Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication. Genes Dev. 2007;21:2908–22.
23. Vaites LP, Lian Z, Lee EK, Yin B, DeMicco A, Bassing CH, Diehl JA. ATM deficiency augments constitutively nuclear cyclin D1-driven genomic instability and lymphomagenesis. Oncogene. 2013;33:129–33.
24. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Mol Cancer. 2007;6:24.
25. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells. Cancer Res. 2011;71:1690–9.
26. Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, et al. Degradation of Cdc25A by β-TrCP during S phase and in response to DNA damage. Nature. 2003;426:87–91.
27. Kanie T, Onoyama I, Matsumoto A, Yamada M, Nakatsumi H, Tateishi Y, et al. Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. Mol Cell Biol. 2012;32:590–605.
28. Wei S, Yang HC, Chuang HC, Yang J, Kulp SK, Lu PJ, et al. A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. J Biol Chem. 2008;283:26759–70.
29. Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, et al. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. Nature. 2011;470:104–9.
30. Ren H, Koo J, Guan B, Yue P, Deng X, Chen M, et al. The E3 ubiquitin ligases β-TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. Mol Cancer. 2013;12:146.
31. Jin J, Ang XL, Ye X, Livingstone M, Harper JW. Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. J Biol Chem. 2008;283:19322–8.
32. Loveless TB, Topacio BR, Vashisht AA, Galaang S, Ulrich KM, Young BD, et al. DNA damage regulates translation through β-TRCP targeting of CReP. PLoS Genet. 2015;11:e1005292.
33. Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. A family of mammalian F-box proteins. Curr Biol. 1999;9:1180–2.
34. Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8:438–49.
35. Thomas Y, Coux O, Baldin V. βTrCP-dependent degradation of CDC25B phosphatase at the metaphase-anaphase transition is a pre-requisite for correct mitotic exit. Cell Cycle. 2011;9:4338–50.
36. Grigoreva TA, Tribulovich VG, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. Oncotarget. 2015;6:24733–49.
37. Dreyling M, Ferrero S, on behalf of European Mantle Cell Lymphoma Network. The role of targeted treatment in mantle cell lymphoma: is transplant dead or alive ? Haematologica. 2016;101:104–14.
38. Mohanty A, Sandoval N, Das M, Pillai R, Chen L, Chen RW, et al. CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. Oncotarget. 2016;7:73558–72.
39. Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chan FC, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-κB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. Nat Med. 2014;20:87–92.
40. Ma J, Lu P, Guo A, Cheng S, Zong H, Martin P, et al. Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. Br J Haematol. 2014;166:849–61.
41. Saba NS, Liu D, Herman SE, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-κB activation in mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128:82–92.
42. Acosta-Alvear D, Cho MY, Wild T, Buchholz TJ, Lerner AG, Simakova O, et al. Paradoxical resistance of multiple myeloma to proteasome inhibitors by decreased levels of 19S proteasomal subunits. elife. 2015;4:e08153.
43. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, Krishnan AY, Carroll MP, Alsina M, et al. Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. Br J Haematol. 2011;153:729–40.
44. Nakashima T, Ishii T, Tagaya H, Seike T, Nakagawa H, Kanda Y, et al. New molecular and biological mechanism of antitumor activities of KW-2478, a novel nonansamycin heat shock protein 90 inhibitor, in multiple myeloma cells. Clin Cancer Res. 2010;16:2792–802.
45. Ishii T, Seike T, Nakashima T, Juliger S, Maharaj L, Soga S, et al. Anti-tumor activity against multiple myeloma by combination of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, with bortezomib. Blood Cancer J. 2012;2:e68.
46. Heimberger T, Andrulis M, Riedel S, Stuhmer T, Schraud H, Beilhack A, et al. The heat shock transcription factor 1 as a potential new therapeutic target in multiple myeloma. Br J Haematol. 2013;160:465–76.
47. Bustany S, Cahu J, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Sola B. Heat shock factor 1 is a potent therapeutic target for enhancing the efficacy of treatments for multiple myeloma with adverse prognosis. J Hematol Oncol. 2015;8:40.
48. Shah SP, Nooka AK, Jaye DL, Bahlis NJ, Lonial S, Boise LH. Bortezomib-induced heat shock response protects multiple myeloma cells and is activated by heat shock factor 1 serine 326 phosphorylation. Oncotarget. 2016, in press. doi: 10.18632/oncotarget.10847.
49. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006;6:789–802.
50. Tsvetkov P, Mendillo ML, Zhao J, Carette JE, Merrill PH, Cikes D, et al. Compromising the 19S proteasome complex protects cells from reduced flux through the proteasome. elife. 2015;4:e08467.
51. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. Blood. 2008; 112:2489–99.
52. Lichter DI, Danaee H, Pickard MD, Tayber O, Sintchak M, Shi H, et al. Sequence analysis of β-subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapse multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. Blood. 2012;120:4513–6.
53. Vangala JR, Dudem S, Jain N, Kalivendi SV. Regulation of PSMB5 protein and β subunits of mammalian proteasome by constitutively activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): potential role in bortezomib-mediated anticancer therapy. J Biol Chem. 2014;289:12612–22.
54. Rouette A, Trofimov A, Haberl D, Boucher G, Lavallée VP, D'Angelo G, et al. Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and-extrinsic factor in human cancers. Sci Rep. 2016;6:34019.
55. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. Cancer Stem Cell. 2014;14:275–91.
56. Vlashi E, Lagadec C, Chan M, Frohnen P, McDonald AJ, Pajonk F. Targeted elimination of breast cancer cells with low proteasome activity is sufficient for tumor regression. Breast Cancer Res Treat. 2013;141:197–203.
57. Lagadec C, Vlashi E, Bhuta S, Lai C, Mischel P, Werner M, et al. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. BMC Cancer. 2014;14:152.
58. Ahmed M, Zhang L, Nomie K, Lam L, Wang M. Gene mutations and actionable genetic lesions in mantle cell lymphoma. Oncotarget. 2016;7:58638–48.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

E. Recherche de nouveaux partenaires à la cycline D1 :

Des résultats préliminaires semblent indiquer que la protéine FUS (*Fused in Sarcoma*) également appelée TLS (*Translocated in Liposarcoma*), pourrait être un partenaire de cycline D1 dans le MM et le LCM. Les différents rôles de cycline D1 dépendent intimement, comme nous venons de le présenter, de sa localisation subcellulaire, mais également des différents partenaires qui lui sont associées. Une telle association de cycline D1 avec FUS dans le LCM, pourrait permettre de caractériser des fonctions cellulaires originales dans cette pathologie.

I. La protéine FUS

FUS est une protéine multifonctionnelle impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la transcription, la maturation des ARNm, et dans des pathologies comme les cancers ou les pathologies neurodégénératives (149,150). Dans les cellules hématopoïétiques, un article récent rapporte que FUS est un régulateur de la réponse aux stress génotoxiques et permet le maintien de l'intégrité génomique. FUS intervient à une étape précoce de reconnaissance des cassures double-brin (DSB) en se fixant sur PARP permettant ainsi le recrutement de γH2AX au niveau des extrémités de l'ADN lésé (Figure 35). Une fois γH2AX fixé à l'ADN, de nouvelles protéines de type *RNA Binding Domain* (RBP) comme RBM14 viennent s'associer à FUS au niveau de la cassure permettant ainsi la création d'un environnement favorable aux effecteurs de la réparation des DSB que nous détaillerons ensuite (151).

Notre hypothèse de travail a donc été que les dimères cycline D1/FUS pourraient contrôler les mécanismes de réparation des DSB de l'ADN et donc moduler l'instabilité génomique provoquée par des défauts de réparation retrouvés dans le MM et le MCL.

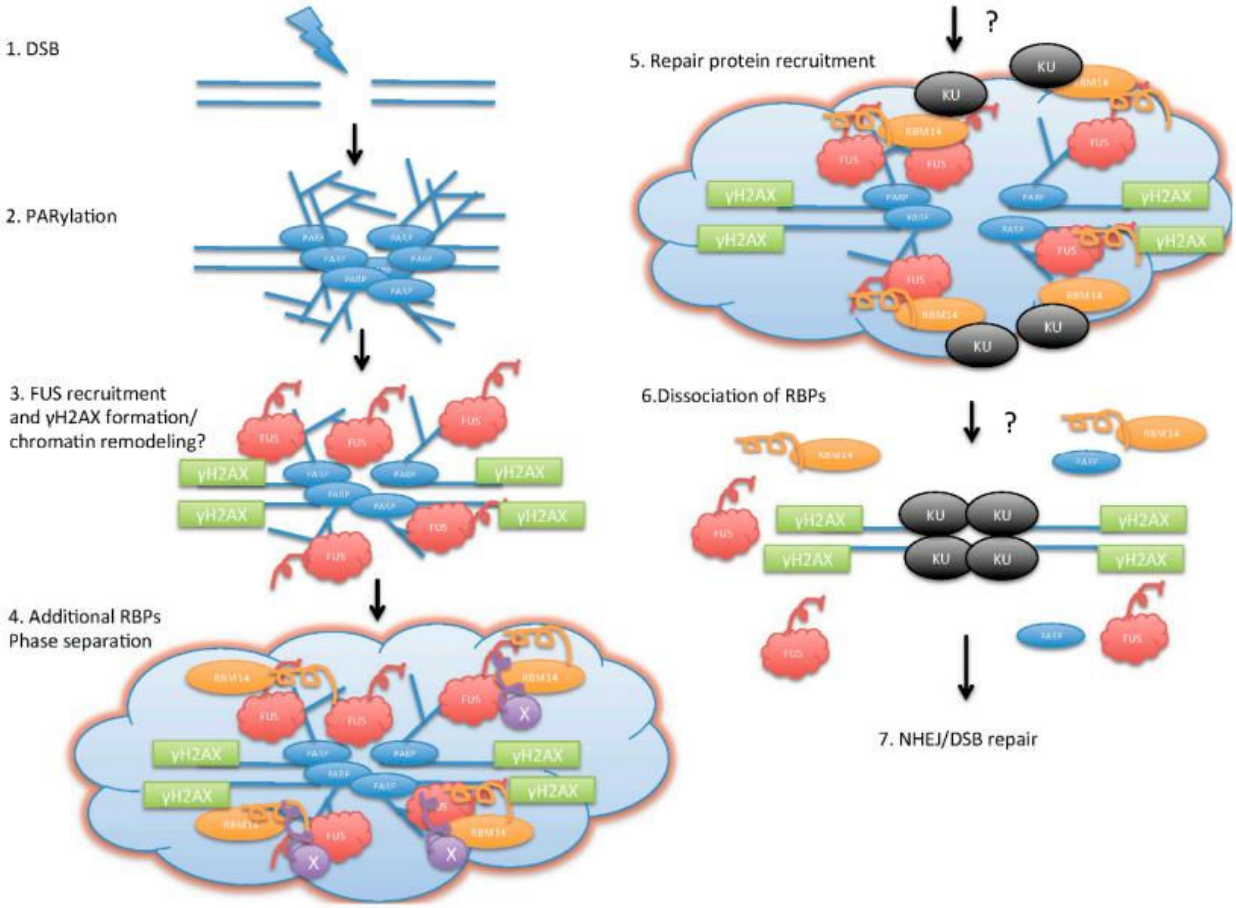


Figure 35. Mécanismes précoces de la réparation des DSB par la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP) et par les *RNA-binding proteins* (RBP). (1) Les stress génotoxiques provoquent des DSB. **(2)** PARP est recrutée autour de la zone de cassure et crée une plateforme pour l'accrochage d'autres protéines. **(3)** FUS est recrutée sur cette plateforme, cette étape permet la formation de γH2AX. **(4)** Sur ces structures sont recrutées des RBP supplémentaires. Ces protéines possédent des *prion-like domain* (PLD) qui forment des agrégats fonctionnels. **(5)** Cet environnement est favorable au recrutement de protéines de réparation des DSB. **(6)** PARP est enfin dégradée provoquant la dissociation des RBPs et permettant la réparation effective des DSB. **(7)** La réparation est dans ce cas de type non homologue (NHEJ). D'après (152).

II. Voies de réparation des dommages à l'ADN

Une fois la reconnaissance des DSB effectuée, deux processus distincts permettent de réparer les DSB, le plus fréquent est *l'homology-directed repair* (HDR) mais qui ne peut être utilisé par la cellule que quand une deuxième copie homologue de l'ADN est présente dans le noyau et donc principalement durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Lorsque cette copie est absente, un autre processus, moins conservateur, appelé *non-homologous end joining* (NHEJ) prend alors le relai.

Lors du processus de HDR, les extrémités lésées de l'ADN sont d'abord réséquées par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) qui possède une activité endonucléase et exonucléase 3'→ 5'. Le déroulement de l'ADN est permis par la sous-unité RAD50. L'extrémité 3' de l'ADN issue de la résection est recouverte par la *replication protein A* (RPA), ce qui permet ensuite le recrutement de la recombinase RAD51 et des protéines qui lui sont affiliées (XRCC2, XRCC3 ainsi que RAD51B, C et D) (153). D'autres protéines interagissent directement avec RAD51 : RAD52 pour faciliter la recherche de l'ADN homologue et RAD54 pour augmenter l'activité de RAD51. Se forme alors un hétéroduplex d'ADN avec la création d'une boucle entre l'ADN lésé et l'ADN homologue. Il s'en suit alors la synthèse d'ADN. À cette étape peuvent survenir des phénomènes de *crossing-over*. BRCA1 et BRCA2, une fois phosphorylés par ATM (*Ataxia telangectasia mutated*), interviennent également dans l'étape de reconnaissance des brins homologues et interagissent directement avec RAD51 (Figure 36) (154).

ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-related*) agissent comme des kinases précoces et régulatrices des voies de réparation aux dommages à l'ADN (DDR). Après la survenue des DSB, ATM/ATR phosphorylent les effecteurs en aval, comme les kinases de point de contrôle (CHK1/CHK2), les facteurs de réparation de l'ADN BRCA1 et 2, RAD51 et MRN ainsi que les régulateurs de la transcription tels que p53 (155). Par la suite, selon le contexte cellulaire, les cellules initient l'arrêt du cycle cellulaire et effectuent la réparation de l'ADN par HDR ou NHEJ. Si les dommages de l'ADN sont trop importants les cellules se dirigent vers l'apoptose.

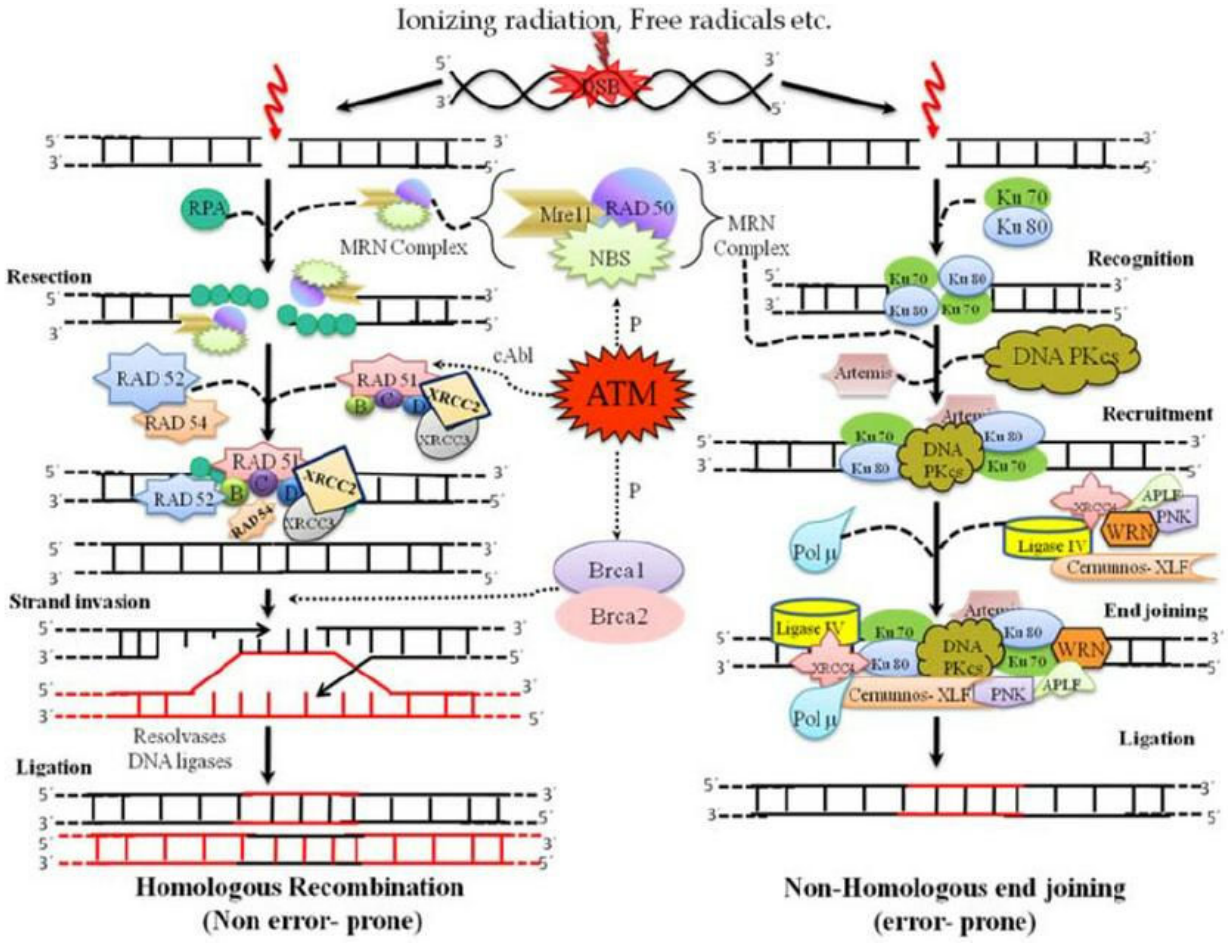


Figure 36 : Les deux voies de réparation des DSB. A gauche la voie de la recombinaison homologue : HDR. Le complexe MRN est recruté à l'extrémité des brins d'ADN et chaque côté de la cassure est phosphorylé. RPA aide l'assemblage de RAD51B/D et XRCC2/3. RAD52 favorise l'assemblage des deux brins d'ADN tandis que RAD54 identifie la séquence homologue. Enfin, la résolution des jonctions de Holliday est complétée par des résolvases et des ligases d'ADN. ATM favorise la réparation par la voie HR en phosphorylant le complex MRN, BRCA1/2, ainsi que RAD51 par l'intermédiaire de c-ABL. **A droite la voie de la recombinaison non homologue des bouts cohésifs : NHEJ**. Ku et ses sous-unités Ku70 (XRCC6) et Ku80 (XRCC5) se lient aux extrémités d'ADN cassées, recrutant PKcs et Artemis. XRCC4 permet à la ligase IV complexée aux facteurs XLF/Cernunos, APLF, WRN, PNK et Polµ de lier l'ADN et de réparer les deux extrémités de la cassure. D'après (156).

Dans la voie du NHEJ, la première protéine de liaison à l'ADN est le complexe hétérodimère Ku, composé de deux sous-unités: Ku 70 (XRCC6) et Ku 80 (XRCC5), qui lient les

extrémités d'ADN cassées et recrutent la sérine/thréonine kinase dépendante de l'ADN (PKC). Les autres protéines impliquées dans le NHEJ dans les cellules de mammifères sont Artemis, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), ADN ligase IV (Lig IV), XLF (facteur de type XRCC4, également appelé Cernunnos), NHEJ1, les ADN polymérases (Pol) μ et λ, PNK (*polynucleotide kinase*) et WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*). Les PKC s'autophosphorylent et phosphorylent plusieurs cibles, y compris les sous-unités Ku, Artemis, XRCC4, WRN. Artemis possède une activité exonucléase 5 '→ 3' ainsi qu'une activité endonucléase. La PNK possède une activité 3'-phosphatase et 5'-kinase et interagit avec XRCC4. L'aprataxine et le facteur de la polynucléotide kinase (APLF) ont à la fois des activités endonucléase et exonucléase tandis que WRN a une activité exonucléase 3 '→ 5'). Il interagit avec Ku et XRCC4 liés à l'ADN et avec le complexe XRCC4/Lig IV. Enfin les ADN Polμ et λ sont recrutées au niveau des DSB *via* leur interaction avec Ku et les complexes XRCC4/Lig IV, ce qui permet de réparer les cassures de l'ADN. La fonction Lig IV est renforcée par les facteurs XLF/Cernunos. Les activités hélicase et exonucléase du complexe RAD50-MRE11-NBS1 (RAD50-MRE11A-NLRP2) peuvent également participer à la voie NHEJ.

III. Résultats préliminaires

Ce travail sur le rôle de FUS et de cycline D1 étant toujours en cours, seulement les premiers résultats de l'étude vous seront présentés ici.

1. Données de protéomique

En collaboration avec Catherine Guette (INSERM U892, CRCNA, Angers), des expériences de co-immunoprécipitation ont été faites dans des conditions stringentes afin de caractériser de nouveaux partenaires de la cycline D1.

Des extraits de cellules entières ont été préparés à partir de trois cultures indépendantes des cellules JeKo-1 (MCL) et U266 (MM) (2 x 10^7 cellules pour chaque échantillon). Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 25 mM d'Hepes pH 7,9, 300 mM de KCl, 0,2 mM d'EDTA, 10% de glycerol (v/v), 10% de NP40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase ne contenant pas d'EDTA, (Roche, Meylan, France). Chaque échantillon a d'abord

été incubé avec 4 µg d'anticorps anti-cycline D1 (sc-718, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, États-Unis) ou IgG de lapin, puis avec 50 µl *protein G-agarose precleared beads* (Invitrogen ™, Carlsbad, CA, USA).

Les billes d'agarose sur lesquelles sont greffées l'anticorps anti-cyclin D1 (expérience) et l'anticorps anti IG de rat (contrôle) sont plongées dans les extraits cellulaires. Après formation des complexes, les billes sont rincées et les protéines sont relarguées dans un tampon de lyse. Les protéines sont ensuite réduites, alkylées et digérées par la trypsine. Chaque échantillon (3 IP et 2 contrôles) est séparé sur une nanoHPLC, spotté sur plaque Maldi avant d'être analysé sur un Maldi-TOF 5800.

L'analyse des spectres de masse sous Protein Pilot permet l'identification de 45 protéines dans la 1ère expérience, 72 dans la seconde et 56 dans la 3ème. Toutes les protéines identifiées ont un score de confiance >99%. La cyclin D1 a été correctement identifiée dans les 3 expériences. Selon la même approche, l'identification des protéines dans les expériences contrôles ont été réalisées. 57 protéines ont été identifiées dans la 1ère expérience et 55 dans la seconde.

Pour identifier d'une manière fiable les partenaires de la cyclin D1, nous avons sélectionné les partenaires d'intérêt de la manière suivante :

- Les partenaires doivent être présents dans les 3 expériences de co-immunoprécipitation
- Les partenaires ne sont pas identifiés dans les expériences contrôles.

Avec ces critères, 3 protéines sont sélectionnées :

CNDP2 : *Cytosolic non-specific dipeptidase*

IMDH2 : *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*

FUS : *RNA-binding protein FUS*

Nous avons choisis de retenir la protéine FUS à cause de son rôle dans la réparation des dommages à l'ADN que nous venons de présenter.

2. FUS est exprimée dans les lignées de LCM et de MM

Avant de pouvoir confirmer les résultats obtenus en protéomique, il est nécessaire de s'assurer de la présence de FUS dans les différentes lignées étudiées. La technique du western

blot permet d'évaluer de manière semi-quantitative l'expression de FUS dans les lignées. Nous avons choisi d'étudier des lignées de LCM exprimant fortement la cycline D1 suite à la translocation t(11;14)(q13;q32) mais également des lignées de MM qui expriment également fortement la cycline D1 soit suite à cette même translocation (Karpas 620, KMS-12-PE, U266), soit par amplification du gène *CCND1* (NCI-H929), soit qui ne l'expriment pas (EJM, IM9, JJN3, L363, LP1, OPM2, RPMI 8226) . L'expression de FUS apparait assez homogène dans les lignées de LCM. En revanche, dans les lignées de MM l'expression de FUS est hétérogène avec des lignées l'exprimant très fortement (IM-9, Karpas-620, KMS-12-PE, L363, OPM2), d'autres ne l'exprimant que faiblement (JJN3, EJM) et enfin des lignées ne l'exprimant pas du tout (LP1, RPMI 8226) (Figure 37).

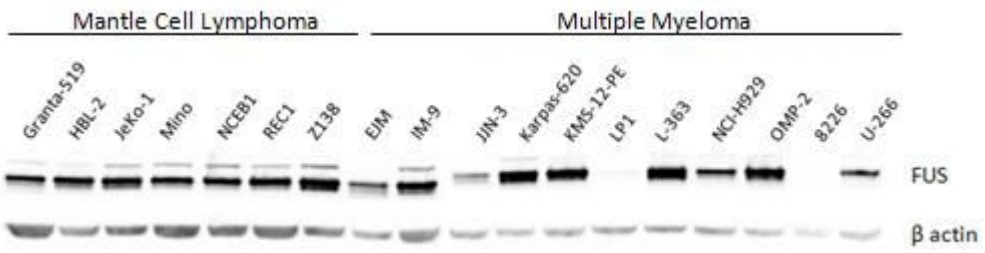


Figure 37 : Expression de FUS dans différentes lignées de LCM et de MM. Les protéines totales de lignées de LCM et de MM ont été purifiées et analysées par la technique de WB.Après migration sur gel d'agarose, les protéines ont été incubées avec l'anticorps anti-FUS/TLS 4H11 (sc-47711 Santa Cruz) et avec l'anticorps anti β actin (sc-4778 Santa Cruz).

3. Colocalisation cycline D1 / FUS

Les données de protéomique montrant une liaison possible entre cycline D1 et FUS, une première analyse de la localisation des deux protéines a été réalisée par immunoflorescence (IF) (Figure 38). La protéine FUS est exclusivement nucléaire (couleur rouge) tandis que cycline D1 est, selon la lignée, à la fois nucléaire et cytoplasmique (couleur verte). On peut observer sur la, que FUS et cycline D1 sont colocalisées (apparition de la couleur jaune issue du mélange des deux fluorophores). Mais la technique d'IF contrairement à des techniques de type *Two hybrid system* (Promega) ne nous permet pas de prouver la liaison directe entre les deux protéines mais seulement de mettre en évidence une colocalisation.

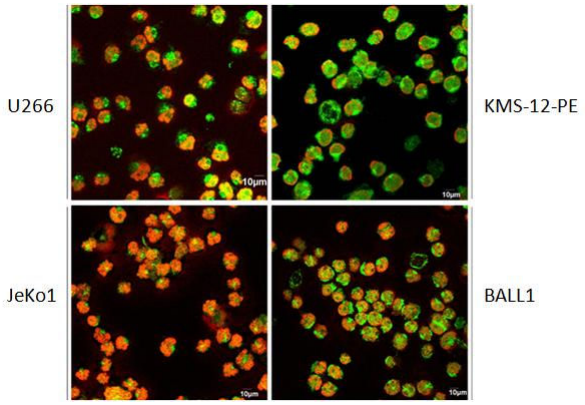


Figure 38 : Localisation subcellulaire en IF de cycline D1 et de FUS. Les cellules (10^5) de deux lignées de MM exprimant cycline D1 (U266 et KMS-12-PE) ainsi qu'une lignée de LCM (JeKo1) et une lignée de leucémie aiguë lymphoblastique B exprimant cycline D1 (BALL-1) ont été déposées sur des lames de verres Superfrost (Thermo Fischer Scientific) par centrifugation (500 rpm, 3 min, température ambiante, Cytospin™ 4 Cytocentrifuge, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Les cellules délimitées dans un spot entouré d'un produit hydrofuge (Dako Pen) ont été fixées par 100 µl de 4% de paraformaldehyde (PFA), 15 min et perméabilisées par 100 µl de 0,2% de Triton X100, 5 min en PBS. Les cellules ont ensuite été bloquées en utilisant 100 µl de tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante : PBS contenant 2% d'albumine bovine sérique (BSA). Les cellules ont ensuite été incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage. L'anticorps anti-cycline D1 utilisé est le M20 (sc-718 Santa Cruz) associé à l'anticorps secondaire vert Alexa Fluor® 488 (A-11029 Life Tech). Après 3 lavages en PBS, l'anticorps anti-FUS/TLS 4H11 (sc-47711 Santa Cruz) a été utilisé puis les lames ont été incubées, après 3 lavages successifs, avec l'anticorps secondaire rouge Alexa Fluor® 633 (A-20170 Life Tech) à l'abri de la lumière, pendant 1 h à température ambiante Après la dernière incubation et 2 lavages, les lames ont été montées en utilisant un milieu de montage contenant du 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Vectashield®, Eurobio, Courtaboeuf, France) afin de faire une contre-coloration des noyaux en bleu. Les lames ont été observées au microscope confocal à balayage laser Olympus SV 1000 (Olympus Imaging America Inc., Center Valley, PA, USA) en utilisant l'objectif 60x à immersion à eau. Les images ont été acquises par une caméra à ouverture numérique : 1.20 (Olympus Imaging America Inc) et traitées avec le logiciel Olympus Fluoview 4.0 (Olympus Imaging America Inc).

4. FUS et CDK4 ne sont pas colocalisés dans les cellules de LCM et de MM.

Un des principaux partenaires de cycline D1 est CDK4, son partenaire catalytique. Des dimères cycline D1/CDK4 sont présents dans les différents compartiments nucléaire et cytoplasmique (86). Il était intéressant de regarder si FUS et CDK4 étaient eux-même colocalisés en utilisant la même méthodologie que précédemment. Dans les lignées que nous avons utilisé, le marquage de FUS était présent uniquement au niveau nucléaire. Sur ces images, la coloration jaune issue de la fusion des couleurs verte et rouge n'apparait pas, signifiant une absence de colocalisation des deux protéines. Il est donc probable que l'action de FUS en association avec cycline D1 soit indépendante de CDK4. Cela nous permet également de confirmer que la technique de colocalisation utilisée est correcte (Figure 39).

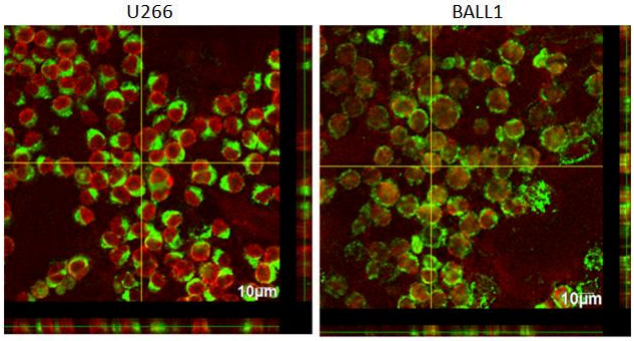


Figure 39 : Analyse en IF de la localisation en IHC de CDK4 et de FUS. En suivant la méthodologie décrite dans la légende de la Figure 35, la lignée de MM U266 ainsi que la lignée BALL1 ont été co-marquées avec l'anticorps primaire anti-CDK4 C-22 (sc-260 Santa Cruz) associé à l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Life Tech) (couleur verte), et avec l'anticorps primaire anti-FUS/TLS 4H11 (sc-47711 Santa Cruz) associé à l'anticorps secondaire Alexa Fluor® 633 (A 20170 Life Tech) (couleur rouge). L'absence de couleur jaune obtenue par superposition des signaux vert et rouge signe l'absence de colocalisation entre les deux protéines.

5. FUS / γH2AX sont colocalisées à la suite d'un stress génotoxique

La protéine FUS étant impliquée dans les mécanismes de reconnaissance, de signalisation des dommages à l'ADN et de la réparation des cassures double-brin, nous avons analysé une éventuelle colocalisation de FUS et des foci γH2AX. En présence de cassures double-brin de l'ADN, l'ensemble des mécanismes de reconnaissance (décrits plus haut) va se mettre en place et aboutir au recrutement de γH2AX par FUS au niveau des extrémités lésées de l'ADN,

formant ainsi des structures ponctuelles au niveau de l'ADN appelées foci. Afin de provoquer des cassures doubles brins de l'ADN nous avons traité durant une courte durée (3 h) deux lignées de LCM : NCEB1 et REC1 avec un inhibiteur de topoisomérase, l'étoposide. Les cellules ont été analysées par IF comme précedemment. La présence du marquage jaune confirme que FUS est présente au niveau des foci γH2AX (Figure 40).

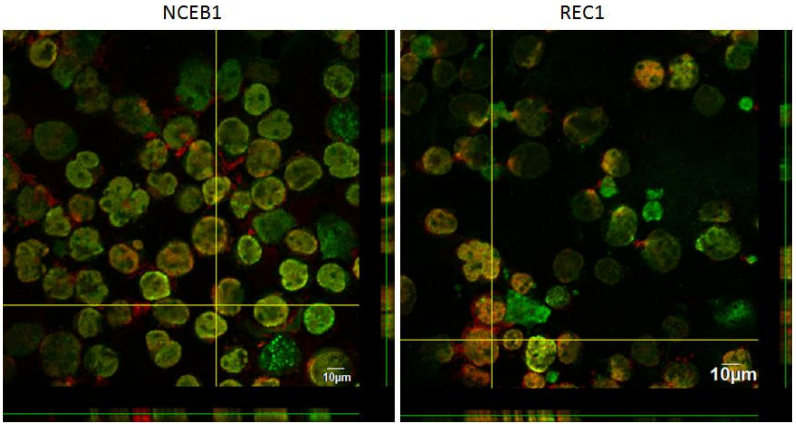


Figure 40 : Analyse de la colocalisation en IF de γH2AX et de FUS. Les lignées de LCM NCEB1 et REC1 ont été traitées pendant 3 h à la dose de 4 µg/ml d'étoposide. Les cellules ont ensuite été co-marquées avec l'anticorps primaire anti-γH2AX EP854(2)Y (ab81299 abcam) associé à l'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor® 488 (A-11029 Life Tech) (couleur verte), et avec l'anticorps primaire anti-FUS 4H11 (Santa Cruz) associé à l'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor® 633 (A20170 Life Tech) (couleur rouge). La couleur jaune est obtenue par superposition des signaux vert et rouge et confirme la colocalisation des deux protéines.

Pour mettre en évidence une colocalisation cyclin D1 et γH2AX, nous avons dû contourner des problèmes techniques : les anticorps anti-cycline D1 et γH2AX performants étant tous les deux produits dans la même espèce (lapin). Nous avons donc utilisé une lignée exprimant à la fois cycline D1 fusionnée à la GFP (8226-D1-GFP), dérivant de la lignée parentale RPMI 8226, produite dans le laboratoire (157). Les cellules ont été traitées à l'étoposide à la dose de 4 µg/ml pendant 3 h pour induire des cassures DSB. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps anti- γH2AX associé à l'anticorps secondaire anti-lapin Alexa Fluor® 633 (A20170 Life Tech) (couleur rouge). Comme le montre la Figure 41, les foci fluorescent en

vert à cause de la GFP et en rouge à cause de γH2AX. Cycline D1 est donc, comme FUS, aussi présente au niveau des foci γH2AX.

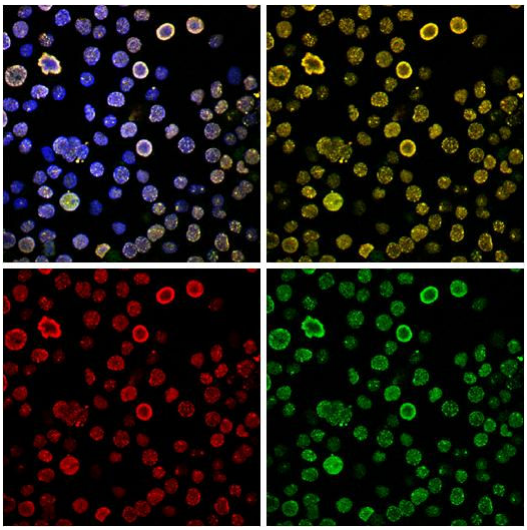


Figure 41 : Analyse de la co-localisation en IHC de la cycline D1 exogène fusionnée avec la GFP et γH2AX par imagerie tridimensionnelle sur la lignée 8226-GFP-D1. La lignée 8226-GFP-D1 a été traitée pendant 3 h à la dose de 4 µg/ml d'étoposide. Les cellules ont ensuite été co-marquées avec l'anticorps primaire anti-γH2AX EP854(2)Y (ab81299 abcam) associé à l'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor 633 (Life Tech) (couleur rouge), la présence de cycline D1 est objectivée par le marquage de la GFP (couleur verte) . La couleur jaune est obtenue au niveau des foci par superposition des signaux vert et rouge et confirme la colocalisation des deux protéines.

6. Réponse des cellules à un traitement à l'étoposide :

Nous nous sommes focalisés ensuite sur l'étude des lignées de LCM qui présentent des sensibilités différentes aux stress génotoxiques (voir publication n°3, page 110). Les lignées Granta-519 et JeKo1 sont les plus sensibles à l'étoposide, la ligné NCEB1 est de sensibilité intermédiaire et la lignée REC1 est quant à elle résistante. Les lignées en culture ont été traitées par une dose de 4 µg/ml d'étoposide pendant différents temps (3-24 h). L'expression des protéines FUS, cyclin D1 et γH2AX a été analysée par western blot (Figure 42). Dans les lignées JeKo1, Granta519 et NCEB1, la quantité de DSB, évaluée par le niveau d'expression de γH2AX, augmente au cours du temps et atteint un seuil maximum à 6 h. Une fois ce seuil atteint, la quantité de DSB reste stable, il n'y a pas de réparation, les cellules meurent au-delà de 24 h de

traitement. Très tôt après le traitement, l'expression de cycline D1 diminue alors que le niveau d'expression de FUS reste stable et ne diminue qu'au temps tardif (24 h). D'autre part, dans la lignée REC1, le niveau de DSB augmente rapidement, dès 2 h après le début du traitement. Cependant, le niveau de γH2AX se normalise sur des temps plus longs, ce qui signifie que la réparation des DSB a eu lieu. Durant ce temps, l'expression de cycline D1 diminue lorsque le niveau de γH2AX est à son maximum, avant de revenir à son niveau basal, après réparation pour la lignée Rec1. Le niveau de FUS reste inchangé durant les temps étudiés.

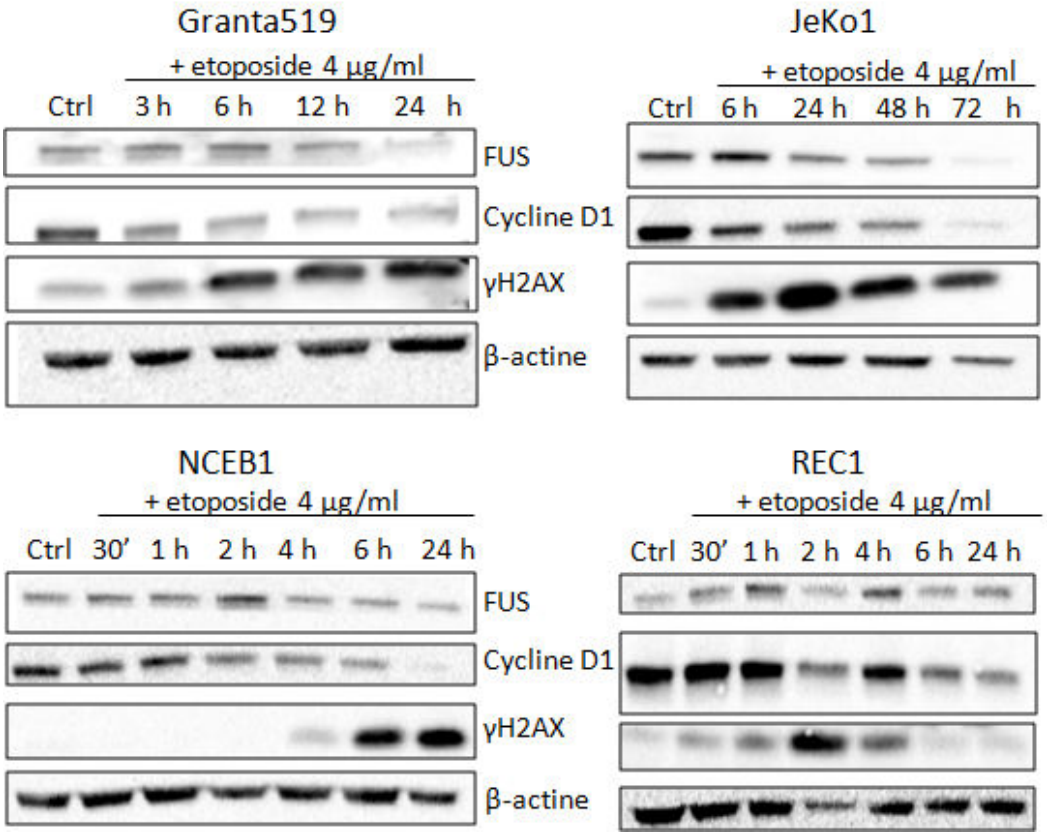


Figure 42 : Cinétique de traitement à l'étoposide dans les lignées de LCM. Les cellules Granta-519, JeKo-1, NCEB1 et Rec1 ont été traitées pendant 3 h à 24 h par 4µg/ml d'étoposide. Les protéines totales ont été purifiées, séparées par SDS-PAGE, transférées sur membranes de nitrocellulose et incubées avec les anticorps déjà cités. Le marqueur de poids moléculaire Page Ruler™ Broad Range Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) permet de confirmer les tailles des protéines FUS 4H11 (Santa Cruz), cycline D1 M20 (Santa Cruz) et γH2AX EP854(2)Y (ab81299 abcam). L'anticorps anti β-actine sert à confirmer la quantité de protéines déposées par puits et la qualité du transfert.

Afin de comprendre les variations d'expression des protéines au cours du temps lors d'un traitement par l'étoposide, nous avons analysé la cinétique de dégradation des protéines FUS et cycline D1 en réalisant un traitement par 50 µg/ml de cycloheximide afin de bloquer la synthèse protéique. Dans les deux lignées de LCM les plus sensible :Granta-519 et JeKo-1, sur une cinétique courte de 180 min, l'expression de FUS reste stable au court du temps, cela signe une cinétique de dégradation longue. En revanche pour cycline D1, à 40 min plus de la moitié du signal a été perdu pour Granta519 et à 90min pour JeKo1. Afin d'affiner ces résultats, la demi-vie de cycline D1 a été calculée en utilisant le logiciel GraphPad Prism, sur un modèle de régression non linéaire log(inhibitor) vs normalized response -- variable slope. Nous avons trouvé une demie vie de 30 min pour Granta-519 et de 63 min pour JeKo1 (Figure 43).

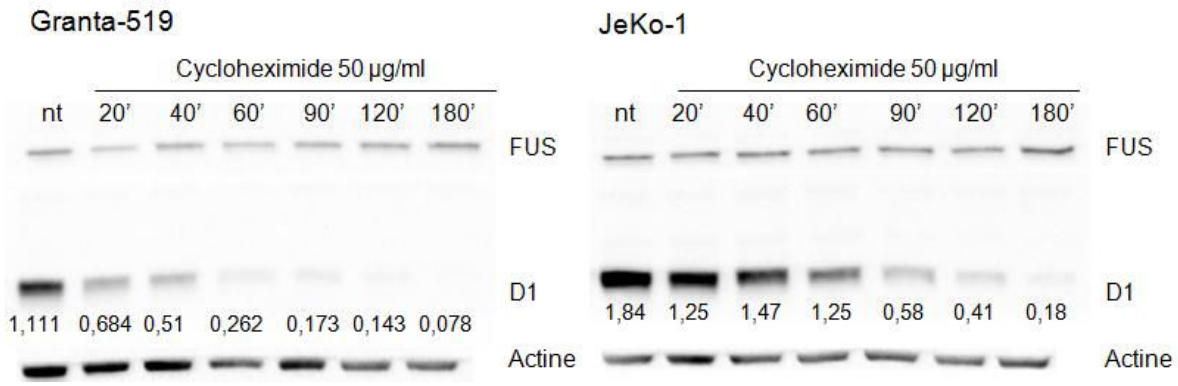


Figure 43 : Cinétique de dégradation des protéines FUS et cycline D1 : Les lignées de LCM, Granta519 et JeKo1 ont été traitées par le cycloheximide à la dose de 50 µg/ml et récupérées différents temps après le traitement (20-180 min). Les anticoprs anti FUS 4H11 (Santa Cruz) et anti cycline D1 M20 (Santa Cruz) ont été utilisés, afin de réaliser une étude cinétique sur la vitesse de dégradation de ces protéines.

IV. Perspectives

Afin de poursuivre ces travaux engagés et afin de déterminer avec précision le rôle de cette association entre cycline D1 et FUS, nous prévoyons de réaliser des transfections avec des plasmides d'expression codant pour cycline D1 et FUS séparément puis conjointement dans la lignée de MM LP1, n'exprimant aucune des deux protéines (cf. Figure 34). Avec l'aide de cette lignée nous allons pouvoir observer de manière quantitative l'impact de l'expression de cycline D1 et de FUS sur les mécanismes de réparation en évaluant en cytométrie en flux le niveau de

γH2AX. Symétriquement, nous allons éteindre FUS et/ou cycline D1 dans nos lignées modèles afin de voir si cette extinction influe sur les capacités de réparation des lignées, notamment la lignée REC1.

Discussion

A. Les modèles in vivo de lymphome à cellules du manteau

Notre objectif était de créer un modèle murin de LCM, le plus fidèle possible de la pathologie humaine, nous permettant de mimer les interactions cellules tumorales/microenvironnement et de pouvoir réaliser un monitorage de la croissance tumorale. Notre modèle est fiable (l'efficacité de prise de greffe est de 100%), sensible (la détection des foyers tumoraux se fait de manière précoce), quantitatif (le nombre de photons mesurés est proportionnel à la masse tumorale et est comparable d'une semaine à l'autre et d'une souris à l'autre). Comme dans la pathologie humaine les organes hématopoïétiques sont infiltrés par les cellules tumorales ainsi que certains organes connus pour présenter des métastases, comme le cerveau ou les intestins.

Ce modèle nous a permis et va nous permettre d'évaluer de manière qualitative et quantitative l'effet de molécules anticancéreuses. La localisation des cellules tumorales est relativement fidèle à la pathologie. Ceci nous permet de nous placer dans des problématiques de pharmacocinétique et de pharmacodynamie proches de la pathologie humaine. De plus, ce modèle tient compte des effets du micro-environnement sur les cellules tumorales et notamment du phénomène de CAM-DR (*cell adhesion mediated-cell resistance*). Ce modèle est d'autant plus intéressant pour évaluer l'effet de molécules qui interagissent avec le microenvironnement. Comme nous le verrons plus loin, ce modèle permet aussi de minimiser le risque de faux-positifs. En effet une molécule peut apparaitre efficace dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée, alors qu'elle n'a aucun effet sur la prise de greffe et la croissance tumorale dans notre modèle.

Le modèle *in vivo* que nous avons établi présente cependant un certain nombre de limites. Tout d'abord, c'est un modèle animal et donc, par essence, imparfait dans la description

d'une pathologie humaine. Par ailleurs, le LCM est une pathologie qui a pour origine le ganglion lymphatique, or, nous avons utilisé des souris immunodéprimées SCID ou NSG qui n'ont pas de ganglions fonctionnels et qui ne possèdent pas de lymphocytes. Cette absence est un point négatif majeur mais que nous ne pouvons absolument pas contourner. Par ailleurs l'utilisation de souris immunodéprimées ne reflète pas le comportement physiologique de l'organisme vis-à-vis d'une tumeur, et peut par conséquent entrainer des biais d'analyse, notamment, en minorant l'effet thérapeutique de molécules ayant un impact sur le système immunitaire, comme par exemple le lénalidomide qui est un immunomodulateur. D'autre part, l'absence, le plus fréquemment, ou la très faible présence de cellules tumorales dans le sang périphérique est un deuxième point de différence avec la pathologie. Ceci est peut-être le reflet d'une sensibilité faible de la détection des cellules en CMF, les cellules nucléées étant peu nombreuses à cause du faible volume de sang disponible.

B. Les agonistes aux ERβ n'ont pas d'effet in vitro et in vivo sur les cellules de lymphome du manteau

Les résultats obtenus par Yakimchuk *et al.* (72) étaient plein d'espérance, car ils ouvraient des perspectives de thérapeutiques nouvelles en décrivant une cible jamais étudiée dans le LCM : ERβ. La découverte d'une nouvelle cible thérapeutique est toujours d'un intérêt majeur et encore plus dans une pathologie où les phénomènes de résistance sont très fréquents et provoquent une rechute de la maladie. En effet, pouvoir cibler une nouvelle voie de signalisation permet de prévenir toute résistance croisée entre molécules aux mécanismes d'action proches. Par ailleurs, l'existence d'agonistes sélectifs permet d'envisager des effets secondaires moindres, ceux-ci étant toujours problématiques dans les stratégies thérapeutiques anticancéreuses. D'autre part, le récepteur ERβ n'est présent que sur un nombre limité de cellules permettant de réduire, de cette manière, les atteintes des tissus sains. De plus, les agonistes de ces récepteurs pourraient être employés dans d'autres pathologies, notamment d'autres hémopathies malignes de type B. En effet, des résultats similaires à ceux obtenus dans le LCM ont été observés dans un modèle de lymphome de Burkitt (72). Nous souhaitions

apporter notre contribution à ces résultats, en confirmant et en renforçant ceux-ci en utilisant des modèles animaux reproduisant plus fidèlement la pathologie humaine. Nous souhaitions également apporter des éléments de comparaison entre deux agonistes le DPN et l'ERB-041, et, ainsi éventuellement montré un avantage de ce dernier, plus sélectif.

Après avoir confirmé l'expression d'ERβ dans les lignées de LCM que nous avons utilisées, nous n'avons pas obtenu *in vitro* les résultats attendus. En effet, les agonistes DPN et ERB-041 n'ont aucun effet sur la prolifération ou la survie des lignées de LCM. Puisque ces agonistes pouvaient contrôler la dissémination des cellules tumorales (72), nous avons analysé *in vitro* les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales dans des tests spécifiques avant et après traitement. Nous n'avons trouvé aucun effet des agonistes sur ces propriétés, le potentiel de migration et d'invasion des cellules de LCM étant maintenu. Nous avons dosé la production de VEGF dans le surnageant de cellules en culture traitées ou non (milieu conditionné). Enfin, nous avons estimé les capacités d'angiogenèse en traitant des cellules endothéliales de cordon humain (cellules HUVEC) avec les milieux conditionnés. Nous n'avons observé aucun effet des agonistes des ERβ. Dans le papier de Yakimchuk *et al.*, seuls des résultats *in vivo* sont présentés (pour rappel, effet des agonistes sur la croissance de la lignée Granta519 greffée s.c.). Il est possible que ces molécules soient actives uniquement *in vivo* pour cette raison, nous avons utilisé le modèle que nous avons mis au point et qui présente des différences majeures avec le modèle sous cutané utilisé par Yakimchuk *et al*. Tout d'abord, suite à l'injection en i.v. des cellules de LCM, celles-ci nichent au niveau des organes hématopoïétiques et sont donc en contact avec des cellules stromales. Ces dernières peuvent délivrer des signaux anti-apoptotiques et pro-prolifératifs qui sont potentiellement capable d'inhiber les effets des drogues. D'autres part, dans ce modèle, la distribution pharmacocinétique des drogues peut être différente, avec une biodisponibilité inférieure dans la moelle osseuse par rapport aux tissus sous-cutanés. Ces différences sont à prendre en compte pour l'analyse des résultats. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires différentes REC1-GFP-Luc et Z138-Luc injectées i.v. dans des souris NSG (n = 9 par lignée). Ce même jour, les souris ont été réparties en trois groupes de façon aléatoire et les traitements par le DPN, l'ERB ou contrôle (0,1% DMSO) ont débuté. Les souris ont été analysées au cours du temps mais nous

n'avons observé aucune diminution du signal luminescent dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle. Le faible nombre de souris par groupe est cependant un point délicat pour l'analyse statistique. Nous sommes cependant très loin des diminutions massives des masses tumorales observées par Yakimchuk *et al*. De plus, les 2 lignées de LCM utilisées Z138 et REC1 sont différentes de la lignée Granta519, utilisée par Yakimchuk *et al*.. En fait, nous n'avons pas réussi à obtenir la lignée Granta519 exprimant les gènes de GFP et de luciférase. Il est cependant à noter que les trois lignées se comportaient de manière identique *in vitro*. Yakimchuk *et al* ont observé des effets anti-angiogèniques des agonistes d'ERβ. Bien que nous n'ayons pas retrouvé ces effets *in vitro*, ceux-ci pourraient avoir un plus grand impact sur la prolifération tumorale dans un modèle de xénogreffe sous-cutané. En effet, dans ce dernier modèle la néovascularisation est cruciale pour apporter à la tumeur oxygène et nutriments contrairement au modèle où les cellules tumorales sont domiciliées dans les organes hématopoïétiques déjà bien irrigués.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats décevants nous portent à dire que l'utilisation des agonistes d'ERβ en monothérapie chez la souris n'est pas à envisager en raison de leur manque d'activité. Cependant, il a été décrit que les œstrogènes jouaient un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation du BCR (158), d'autres approches pourraient donc être intéressantes sur l'utilisation d'agonistes d'ERβ en association, cette fois avec des inhibiteurs du BCR comme l'ibrutinib.

C. Le nouveau role de la forme cytoplasmique de cycline D1

La cycline D1 joue un rôle majeur dans la physiopathologie du LCM, la translocation activatrice t(11;14)(q13;q32) en est le premier *« hit »* oncogénique. L'expression abondante de cet oncogène dans des lymphocytes B matures, qui ne l'expriment pas normalement, va provoquer une cascade d'altérations génomiques qui vont aboutir à la pathologie. En association avec les CDK4 et 6, cycline D1 va déréguler le cycle cellulaire, provoquant une prolifération non contrôlée des cellules. Au-delà de ce rôle bien connu de cycline D1, celle-ci en

possède de nombreux autres qui dépendent des partenaires qui lui sont associés ainsi que de sa localisation subcellulaire (159). Cependant, peu de données concernant le LCM sont disponibles dans la littérature.

Lors de l'étude de la localisation subcellulaire de cycline D1 par immuno-fluorescence, nous avons observé parmi les cinq lignées de LCM étudiées deux groupes distincts. Un premier groupe, avec les lignées JVM2, Granta, Mino, NCEB1 et REC1 dans lesquelles cycline D1 est à la fois nucléaire et cytoplasmique, mais avec une grande proportion dans le noyau et un second groupe avec les lignées JeKo1 et Z138 dans lesquelles la grande majorité de cycline D1 est cytoplasmique. Lors d'échanges avec le service d'anatomopathologie du centre Henri Becquerel (Rouen), nous nous sommes rendus compte que ces différentes localisations étaient également retrouvées chez les patients avec un LCM (6/42 patients avaient des cellules tumorales avec une cycline D1 cytoplasmique). Nous avons confirmé ces observations microscopiques par l'analyse de l'expression de cycline D1 dans des extraits protéiques nucléaire et cytoplasmique. La qualité des extraits protéiques fractionnée est évaluée par la mesure de l'expression relative de HSP 90, qui est une protéine exclusivement cytoplasmique, et de PARP-1, qui est exclusivement nucléaire.

Nous nous sommes posé la question de l'impact clinique que pouvait avoir cette observation chez les 42 patients de l'étude. D'un point de vue clinique, aucune différence significative ne ressort. Nous n'avons pas réalisé d'étude de survie, car les résultats n'auraient pas été interprétables considérant le faible nombre de patients inclus ainsi que l'hétérogénéité des stades au diagnostic ainsi que celle des traitements délivrés dans cette cohorte. Une étude prospective sur un plus grand nombre de patient pourrait cependant s'avérer intéressante. En revanche, d'un point de vue histologique, des différences intéressantes apparaissent avec une proportion plus importante de variant blastoïde - le plus agressif - dans le groupe avec cycline D1 cytoplasmique : 33 *vs*. 3% ($p = 0.048$). De plus, l'indice Ki-67 (qui mesure le degré de prolifération des cellules cancéreuses) est supérieur à 10% dans 100% des cas. Dans leur ensemble ces résultats permettent de dire que la localisation cytoplasmique de cycline D1 est associée à un phénotype tumoral plus agressif. Il faudrait étendre cette cohorte et passer d'une étude monocentrique à une étude multicentrique.

Nous nous sommes posés la question du rôle de la forme cytoplasmique de cycline D1. Puisque les rôles de cycline D1 sont dépendants de ses partenaires, nous avons cherché quelles protéines cytoplasmiques lui étaient liées. Sur des extraits protéiques enrichis en protéines cytoplasmiques (tampon de lyse NP40), en collaboration avec la plateforme Protim (Biogenouest, Rennes), nous avons réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps anti-cycline D1 dirigé contre la forme canonique de cycline D1. Les complexes protéiques ont été séparés sur gel 1D et analysé par spectrométrie de masse. Nous avons utilisé deux types de lignées cellulaires exprimant cycline D1, la lignée de LCM JeKo1 et la lignée de myélome multiple U266. Ce type d'analyse protéomique « haut débit » avait déjà été utilisé avec succès dans le passé (160). L'étude avait montré que les partenaires de cycline D1 pouvaient être communs à plusieurs localisations cancéreuses. Parmi les 200 protéines associées à cycline D1 dans les cellules JeKo1, nous avons trouvé que 25% d'entre elles étaient des protéines du cytosquelette et nous avons confirmé la liaison de cycline D1 à la β-actine et la α-tubuline par WB. Un des rôles du cytosquelette dans la cellule cancéreuse est de pouvoir modifier la structure cellulaire afin que celle-ci puisse migrer dans la circulation et envahir d'autre tissus et ainsi former des métastases. Nous nous sommes donc intéressé au potentiel d'invasion et de migration des cellules de LCM. En utilisant des chambres de Boyden, nous avons regardé la capacité des cellules de LCM qui ont un diamètre de 11 à 14 µm (Tableau 6), de traverser les pores des membranes d'un diamètre de 5 µm de sous l'effet d'un chimioattractant, le SDF1α.

Tableau 6 : diamètre des lignées de LCM

Lignée	Granta-519	JeKo-1	JVM2	Mino	NCEB1	Rec	Z138
Diamètre (µm)	12.7	12.8	12.8	12	14.3	11.7	11.7

Selon le mécanisme analysé, ces membranes étaient recouvertes, ou non, d'un mélange de protéines mimant la une matrice extracellulaire (invasion ou migration). Nous avons montré qu'il existait une différence significative entre le potentiel de migration et d'invasion entre, d'une part les deux lignées JeKo1 et Z138, exprimant une forme de cycline D1 majoritairement cytoplasmique, et d'autre part, les cinq autres lignées exprimant une forme de cycline D1 majoritairement nucléaire ($p < 0.001$ avec le test *t* de Student). De plus, nous avons transfecté la lignée JVM2 qui exprime très faiblement cycline D1, par rapport aux autres lignées de LCM, avec

un plasmide codant pour la cycline D1a (nucléaire et cytoplasmique), la cycline D1b (majoritairement nucléaire) ou un contrôle GFP. Pour rappel, l'isoforme b ne possède pas le résidu Thr286, nécessaire à l'export nucléaire codé par l'exon 5 (161). Nous avons montré que l'expression de cycline D1a entrainait un doublement du potentiel de migration de la lignée JVM2 par rapport aux cellules transfectées par la forme D1b et le plasmide contrôle ($p < 0.01$ avec le test *t* de Student). Ces résultats sont en cohérence avec ceux de Fusté *et al.*, démontrant que cycline D1 artificiellement attachée à la membrane plasmique, contrôle l'invasion des fibroblastes HEK293T et des cellules de carcinome de prostate R3327-5' (162). Par ailleurs, cette même équipe a montré dans des cellules de carcinome prostatique, que la forme cytoplasmique de cycline D1 associée à CDK4 phosphoryle la paxilline provoquant ainsi une diminution de sa demi-vie. En effet, la paxilline est une protéine intracellulaire qui s'associe à l'intégrine au niveau des points d'adhésions focales intervenant dans les mécanismes d'adhérence cellulaire, sa dégradation précoce permet donc le contrôle des mécanismes d'invasion et de métastase dans cette pathologie (162). D'autres travaux ont montré que les complexes cyclin D1/CDK4 phosphorylent la filamin A (protéine de liaison à l'actine), affectant ainsi le potentiel de migration et d'invasion de cellules de cancer du sein (163). Nous n'avons retrouvé par WB aucune phosphorylation de la paxillin ni de la filamin A. Nous nous sommes également intéressé à la cofilin car c'est également une protéine de liaison à l'actine et nous n'avons retrouvé aucune phosphorylation de cette protéine dans les lignées de LCM. La cycline D1 doit donc contrôler le potentiel de migration et d'invasion par le biais d'autres protéines dans cette pathologie. Il serait intéressant d'explorer si ce contrôle de la migration et d'invasion s'effectuerait par l'intermédiaire d'autres protéines que nous avons trouvé comme associé à cycline D1 dans les expériences de protéomique, comme par exemple profilin-1, qui est une protéine régulant la polymérisation de l'actine, ou encore stathmin 1 qui régule la rapidité de repolymérisation des microtubules. Par ailleurs, l'intervention de CDK4 et 6 en collaboration avec cycline D1 est importante dans les mécanismes de migration, en effet nous avons montré que l'utilisation de palbociclib sur les lignées JeKo-1 et Z138 diminuait le potentiel de migration. L'action de cycline D1/CDK4 pourrait donc passer par la phosphorylation de ces différentes protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette.

Les différentes lignées JeKo1-mCherry-Luc, REC1-GFP-Luc, Granta-GFP et Z138-Luc ont été greffées dans des souris SCID et NSG. Nous avons observé une différence dans la rapidité de prise de greffe, évaluée par l'apparition du premier signal de bioluminescence. Ainsi, le premier signal de bioluminescence a été observé à J8 (pour JeKo1) et J15 (pour Z138) contre J29 (pour REC1). Ces résultats vont dans le sens de nos observations, à savoir une plus grande agressivité de la pathologie, lorsque cycline D1 est présent majoritairement au niveau cytoplasmique.

Afin de confirmer ce rôle de cycline D1 cytoplasmique dans ces mécanismes d'invasion, nous avons traité *in vitro* les lignées JeKo1 et Z138 par du KPT-330. Dans ces conditions, cycline D1 est localisée dans le compartiment nucléaire 24 h après le traitement. Nous avons observé une diminution significative du potentiel d'invasion et de migration des cellules ($p < 0.001$), lorsque la cycline D1 est localisée dans le noyau.

Nous avons ensuite analysé l'effet du KPT-330 *in vivo*. Les souris SCID xénogreffées avec la lignée JeKo1-mCherry-Luc ont été traitées deux fois par semaine par du KPT-330 *per os*. Les premiers signaux de bioluminescence sont détectés plus tardivement dans le groupe traité que dans le groupe contrôle. D'autre part, le nombre de photons émis est significativement plus faible dans le groupe traité que dans le groupe contrôle, et ce tout au long de l'expérience indiquant que les tumeurs dans les animaux traités sont plus petites. De plus, la localisation des cellules tumorales est différente. Dans le groupe traité, les foyers de luminsecence ne sont plus observés dans les membres, alors que c'est la localisation principale du groupe contrôle. Au contraire, des foyers de bioluminescence sont toujours observés dans le cerveau. Dans les quelques cellules tumorales présentes dans les biopsies de moelle osseuse dans le groupe des souris traitées, cycline D1 est exclusivement nucléaire. Ces données mettent en évidence un impact du traitement sur la rapidité de prise de greffe, sur la masse tumorale et sur la domiciliation des cellules tumorales. En accord avec ces données, le KPT-330 restreint la propagation de tumeurs et les métastases de cellules de cancer de la prostate injectées soit dans la prostate, dans les os ou le cœur pour mimer la maladie humaine (164). Ces effets sont obtenus grâce à une sécrétion réduite de métalloprotéinases et d'urokinase. Il serait donc intéressant de regarder si le ciblage d'ADAM10, une protéine de surface possédant une activité

protéase et un rôle dans l'adhérence, ou d'un autre membre de la famille des métalloprotéines, pourrait agir de manière synergique avec le KPT-330 dans la prise en charge thérapeuthique.

XPO1 permet l'export nucléaire, en plus de cycline D1, de nombreuses autres protéines, des suppresseurs de tumeurs (p53, p73, FOXO1), des facteurs de transcription, des protéines de signalisation, des complexes ARN/protéines, des régulateurs du cycle cellulaire (RB1, p21,CDC25a) ou encore des molécules anti-apoptotiques (nucléophosmine, survivine) (165). Il est à noter que le KPT-330 est un antagoniste irréversible de XPO1, empêchant la fixation de l'ensemble de ses protéines cargo. Par conséquent, l'effet d'inhibition de l'invasion et de la migration pourrait ne pas dépendre uniquement de la relocalisation de cycline D1 au niveau nucléaire. Cependant, l'ensemble de nos résultats ainsi que les données de la littérature dans d'autres pathologies, sont cohérents avec un rôle de cycline D1 dans les mécanismes d'invasion et de migration dans le LCM.

Nous avons montré que le traitement *in vitro* et *in vivo* par le KPT-330 provoquait une expression uniquement nucléaire de cycline D1, et que ce traitement permettait un ralentissement de la croissance tumorale *in vivo*. Il est intéressant de noter que c'est la forme nucléaire de cycline D1 qui est transformante, car la régulation de la transcription et du cycle cellulaire s'effectue dans ce compartiment subcellulaire. Nous pouvons donc supposer que dans le modèle in vivo, les capacités transformantes apportées par la forme nucléaire sont déjà obtenue avec les taux modérés de cycline D1 nucléaire que nous retrouvons dans les lignées Z138 et JeKo-1 et que la relocalisation de cycline D1 exclusivement au niveau nucléaire permet de s'affranchir des propriétés oncogèniques apportées par la forme cytoplasmique comme l'augmentation du potentiel de migration et d'invasion, sans augmenter de manière excessive le potentiel de division cellulaire induit par l'augmentation du niveau nucléaire de cycline D1, au final la localisation exclusivement nucléaire de D1 provoquée par le KPT-330 résulte en une diminution de la croissance tumoral et le traitement est donc bénéfique.

Pris dans leur ensemble, ces résultats nous permettent de conclure que la forme cytoplasmique de cycline D1 contrôle l'invasion et la migration des cellules de LCM. De plus, bien que ces résultats soient à confirmer et que les bénéfices thérapeutiques du KPT-330 à

évaluer dans des essais cliniques dans le LCM, la détermination de la localisation subcellulaire de cycline D1 au moment du diagnostic pourrait être intéressante afin de traiter de manière plus efficace les patients, à l'ère de la médecine personnalisée. En particulier, la combinaison du KPT-330 (ou des SINE de nouvelle génération) avec le bortezomib ou le carfilzomib, actuellement utilisé en clinique pourrait être intéressant. En effet, de telles combinaisons pourraient avoir un impact sur l'agressivité des cellules tumorales LCM et ainsi limiter leur propagation, le KPT-330 rendant les cellules tumorales plus accessibles à ces chimiothérapies, hors de leurs niches physiologiques. Cela a été réalisé avec succès pour les patients atteints de myélome multiple (166).

D. Une diminution de l'activité du protéasome 26S est responsable de la résistance aux stress génotoxiques

Bien que les stratégies thérapeutiques dans le traitement du LCM aient évolué ces dernières années, la maladie reste largement incurable à cause de l'apparition de clones chimiorésistants provoquant des rechutes (38). Il est donc nécessaire de mieux comprendre ces phénomènes de résistance afin d'améliorer leur prise en charge clinique. Nous avons étudié la réponse d'un panel de lignées cellulaires de LCM à un stress génotoxique provoqué par l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase, et nous avons observé une réponse hétérogène parmi les lignées. Ainsi trois profils de sensibilité à l'étoposide ont été mis en évidence : les lignées JeKo1, Granta519 et Mino présentent une grande sensibilité ; la lignée REC1 est, quant à elle, la plus résistante ; enfin la lignée NCEB1 est de sensibilité intermédiaire. Nous avons observé dans la lignée résistante REC1 que trois acteurs principaux impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose, à savoir les protéines cycline D1, MCL1 et CDC25A, qui sont recrutées après un stress génotoxique, ne sont pas dégradées.

Nous avons montré que dans les trois lignées, un traitement par l'étoposide induisait des cassures double-brin de l'ADN (objectivées par une augmentation du nombre de foci γH2AX et la phosphorylation de CHK2 en T68). Nous avons observé également que la lignée REC1 présente un niveau basal important de cassures double-brin de l'ADN. De manière intéressante

et en concordance avec son niveau de résistance, la lignée REC1 est la seule où cycline D1 ne diminue pas au cours du traitement par l'étoposide. Cette absence de dégradation de cycline D1 nous a fait nous interroger sur l'export nucléaire de cycline D1 dans la lignée REC1, première étape de sa dégradation cytoplasmique, des travaux de l'équipe ont montré que XPO1 n'était pas muté dans les lignées de LCM utilisées ici, nous pouvons donc exclure que la persistance de cycline D1 soit liée à un défaut d'XPO1.

Il a été rapporté qu'une protéolyse défectueuse de cycline D1 pouvait survenir dans le LCM suite à des mutations de l'exon 1. En effet, les mutations les plus fréquemment retrouvée par des analyses génomique du gène *CCND1* (18 à 35%) sont de type E36K, Y44D et C47S. Ces mutations provoquent une diminution de la phosphorylation de la thréonine 286, provoquant ainsi la rétention nucléaire de cycline D1 ainsi que l'inhibition de sa dégradation (167). Selon ces données, une stabilité accrue de cycline D1 est un mécanisme majeur de résistance des cellules de LCM. En effet, l'accumulation de cycline D1 provoque une résistance à l'ibrutinib dans les lignées JeKo-1, UPN-1 et Z138 transfectée avec *CCND1* portant les mutations E36K, Y44D ou C47S (167). Ces mécanismes de résistance passeraient par l'activation des voies NF-κB, ERK1/2 et AKT, ainsi que par l'altération des voies de signalisation du BCR (168–170).

Nous avons donc cherché si cycline D1 dans la lignée REC1 était correctement phosphorylée puis exportée vers le cytoplasme. C'est le cas, et ce même après un traitement par l'etoposide, nous pouvons donc exclure qu'une anomalie de la phosphorylation de cycline D1 soit responsable du mécanisme de résistance à l'étoposide que nous observons dans cette lignée.

Puisque, cycline D1 étant correctement exportée vers le cytoplasme dans la lignée REC1, nous nous sommes donc intéressés au fonctionnement du protéasome 26S qui est responsable de la dégradation de nombreuses protéines dont la cycline D1. Nous avons donc réalisé un cotraitement des lignées qui n'étaient pas résistantes à l'étoposide : JeKo1 et NCEB1 avec un inhibiteur du protéasome : le MG132 et avec de l'étoposide. Suite à ce co-traitement, nous avons retrouvé sur ces lignées sensibles, le même comportement de résistance que la lignée REC1 avec un défaut de dégradation des protéines cycline D1, CDC25a et MCL1. Nous avons donc été capable de reproduire le phénotype résistant de REC1 vis-à-vis de l'étoposide en

inhibant le mécanismes de dégradation de ces protéines oncogèniques clés dans la pathologie, expliquant ainsi le mécanisme de résistance.

L'activité catalytique du protéasome 26S est supportée par les sous unités catalytiques de type β du complexe 20S. Nous avons donc cherché quelle activité enzymatique était diminuée entre la lignée JeKo1 sensible et la lignée REC1 résistante. Nous avons mis en évidence une diminution seulement de l'activité catalytique *trypsin-like* dans REC1, les activités *chymotripsin* et *caspase like* étant identique entre les deux lignées. Ainsi, une activité réduite d'une seule unité catalytique du protéasome est donc suffisante pour provoquer une chimiorésistance à l'étoposide.

Des défauts du protéasome sont en effet une source connue de résistance aux chimiothérapies, en effet, dans le MM, des anomalies des sous unités 19S ont été décrites. En effet, une diminution du niveau d'expression des sous unités 19S est responsable de mécanismes de résistances vis-à-vis du carfilzomib qui est un inhibiteur spécifique de la sous unité 20S du protéasome (171). D'autre part, il a été décrit dans le LCM qu'*UBR5* était le 3ème gène le plus muté dans les LCM (18%). Ce gène possède une activité E3 ubiquitin ligase, chargé d'adressé les protéines à dégrader vers le protéasome grâce à des signaux d'ubiquitination. Ce niveau important de mutation permet de montrer l'importance du système ubiquitine/protéasome dans la physiopathologie du LCM (172).

Ainsi dans la lignée REC1, l'activité *trypsin-like* du protéasome 26S est diminuée, cela provoque l'accumulation par non dégradation de protéine oncogèniques comme cycline D1, CDC25A et MCL1. Après un stress génotoxique subi par un traitement par l'étoposide, la cellule tumorale est en mesure de surpasser les signaux d'apoptoses apportés par le traitement, rendant ainsi la cellule résistante.

E. Les dimères FUS/cycline D1 pourraient jouer un rôle dans la réparation des cassures de l'ADN

Les résultats de protéomique ont montré une liaison entre cycline D1 et FUS. Nous avons donc cherché à confirmer ces résultats dans un premier temps, par des techniques d'IHC. Elles nous ont permis d'objectiver la colocalisation des deux protéines mais ces techniques 2D et 3D montrent qu'une colocalisation et pas une liaison. Afin de mettre en évidence par une deuxième technique la liaison, nous avons essayé de mettre en place un système de double hybride (Promega) en réalisant des protéines de fusion entre d'une part FUS-GAL4 et cycline D1-VP16. Si cyclin D1 et FUS sont lié, la proximité stérique va permettre à VP16 d'activer GAL4 et ainsi de provoquer la transcription du gène rapporteur pG5luc. Nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir des plasmides exprimant les protéines de fusion fonctionnelle.

Nous avons donc cherché a montré par western la liaison des deux protéines suites à une immunoprécipitation. Nous avons seulement réussi à mettre en évidence la liaison de cycline D1 et de FUS dans les cellules JeKo-1 lors d'un IP réalisé avec un Ac anti cycline D1, la réciproque avec un anticorps anti FUS n'a pas été démontré. De plus nous n'avons pas réussi à montrer la liaison entre ces deux protéines dans la lignée de MM U266. Nous nous heurtons probablement à des problèmes de stœchiométrie, cycline D1 étant vraisemblablement beaucoup plus abondante que FUS et seulement une fraction des deux protéines sont liées ensemble. Il serait intéressant d'essayer de résoudre ce problème en réalisant l'immunoprécipitation sur des extraits protéiques nucléaires uniquement. En effet FUS n'est présent qu'au niveau nucléaire, donc la liaison ne peut être observée que dans ce compartiment subcellulaire. Ne conserver que la cycline D1 nucléaire, nous permettrait ainsi d'éliminer toute la cycline D1 cytoplasmique et ainsi augmenter la proportion de protéine FUS retenue lors de l'immunoprécipitation anti cycline D1 et donc ainsi augmenter la sensibilité de la technique. Pour le cas de l'immunoprécipitation anti-FUS, la proportion de protéine lié à la cycline D1 doit être relativement faible dans les conditions basale, ne nous permettant ainsi pas de détecter la liaison. Nous supponsons que la liaison entre cycline D1 et FUS se produit au moment de la signalisation des cassures doubles brin lors de la résolution de stress génotoxique. Dans cette

éventualité, il pourrait être intéressant de réaliser l'expérience d'immunoprécipitation après un traitement génotoxique, lorsque les cassures doubles brins sont signalées et avant la diminution dramatique de cycline D1, que nous observons après un tel traitement. Au stade actuel, l'hypothèse de recrutement de cycline D1 et de FUS conjointement au niveau des cassures doubles brins, n'est pas encore assez étayé pour essayer de mettre au point cette technique.

Les rôles que peut remplir cycline D1 dépendent intimement des partenaires qui lui sont associées, nous avons cherché si CDK4 était également impliqué dans la relation entre cycline D1 et FUS. Nous avons donc regardé si CDK4, le partenaire principal de cycline D1, était lui aussi colocalisé avec FUS. Ce n'est pas le cas, nous pouvons donc ainsi exclure mécanisme dépendant de CDK4.

La protéine FUS est décrite comme ayant un rôle dans la réparation de l'ADN en aval de PARP ainsi qu'en relation avec HDAC1 (173,174), il a également été rapporté que cycline D1 est impliquée dans la réparation de l'ADN de manière indépendante de CDK4/6 (116,130,160). Nous supposons donc un rôle des dimères cyclin D1/FUS dans la réparation et plus particulièrement dans la signalisation des dommages à l'ADN. Nous avons donc cherché si cycline D1 et FUS étaient recrutés au niveau des cassures doubles brins de l'ADN dans le LCM. Un des signaux précoce de la reconnaissance de ces cassures double-brin est le recrutement de γH2AX à leur niveau (175). Nous avons montré par IHC, la colocalisation de FUS et de γH2AX ainsi que la colocalisation de cyclin D1 et γH2AX, suggèrant ainsi l'existence de trimères FUS/D1/γH2AX capables de reconnaître les DSB et d'envoyer des signaux de réparation.

Nous avons ensuite étudié ces différents acteurs dans différentes lignées de LCM, après avoir induit des dommages à l'ADN par l'étoposide, à différents temps après le stress afin d'analyser les mécanismes de réparation. Comme déjà montré et publié (Publication 3), nous avons observé plusieurs comportements de lignées cellulaires lors de l'induction de stress génotoxique par l'étoposide. Les lignées JeKo-1 et Granta-519 sont sensibles et ne sont pas capable de réparer les dommages à l'ADN, nous observons un effondrement du niveau de cycline D1. En revanche, la lignée REC1 après le traitement, voit son niveau de γH2AX augmenter puis revenir à son niveau basal en même temps que le niveau de cyline D1 se

normalise après avoir été diminué pendant la phase de réparation des DSB. Il est intéressant de noter que la lignée REC1 possède un niveau basal élevé de γH2AX et ce, en cohérence avec son statut blastoïde particulièrement instable. Cycline D1 apparait donc ici comme ayant un rôle critique dans le mécanisme de réparation des DSB, puisque lorsque son niveau s'effondre, la cellule n'est plus en mesure de réparer ses cassures doubles brins.

Dans toutes les lignées, le niveau de FUS reste stable, durant le temps du traitement. Cette stabilité n'est pas surprenante étant donné que FUS, contrairement à cycline D1 est une protéine à demi-vie longue (>180 min). Ce résultat nous permet donc d'exclure que cycline D1 est un chaperon moléculaire de FUS, puisque la demi vie des deux molécules ne sont pas superposables. Afin de savoir si la présence de FUS est critique dans la survenue de la réparation, nous allons devoir éteindre son expression par siRNA afin de voir si la lignée REC1, lorsqu'elle ne possède plus FUS, est toujours capable de réparer les DSB lors de stress génotoxique. Afin d'obtenir des données quantitatives, nous envisageons de doser le niveau de γH2AX par cytométrie.

Une grande partie du travail reste à faire, il nous est encore nécessaire de caractériser le rôle de ces dimères en réalisant des expériences de transfection de cycline D1 et de FUS dans la lignée de MM LP1 qui n'exprime ni l'un ni l'autre. L'objectif étant de voir si l'apport de ces deux protéines, séparément puis conjointement, modifie les capacités de réparation des dommages à l'ADN de la cellule. De manière complémentaire, nous allons éteindre par siRNA ces deux protéines séparément puis conjointement dans REC1 afin de voir si la lignée est toujours en mesure de réparer les DSB.

Pris dans leur ensemble, ces travaux pourraient aboutir à la mise en évidence d'un nouveau rôle de cycline D1 en association à la protéine FUS dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Des défauts de ces mécanismes entrainent l'accumulation d'altérations génétiques dans les cellules tumorales ainsi que de l'émergence de clones résistants aux thérapeutiques. Si nous réussissons à aboutir à de telles conclusions, il sera intéressant d'évaluer le bénéfice thérapeutique d'un ciblage de FUS dans la prise en charge du LCM, ainsi que dans les autres hémopathies surexprimant la cycline D1.

Conclusion

Au cours de ces 3 ans de thèse nous avons pu mettre en place un modèle d'étude murin fiable, nous permettant de modéliser les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Ces interactions sont fondamentales car elles sont mesures d'annuler (ou au moins de modifier) l'effet de thérapeutiques en plaçant les cellules tumorales dans un environnement protecteur anti-apoptotique et pro-prolifératif.

Grâce à ce modèle, nous avons pu démontrer le manque d'efficacité, d'agonistes aux ERβ. Les travaux de Yakimchuk et ses collaborateurs avaient présenté cette piste thérapeutique comme très prometteuse. Nous avons malheureusement démontré que l'utilisation de ces agonistes n'avaient pas d'effet ni *in vitro*, ni *in vivo*, s'ils étaient utilisés seuls. En revanche, leur utilisation en association avec des inhibiteurs du BCR comme l'ibrutinib pourrait être intéressante, en raison de l'implication des oestrogènes dans le contrôle de cette voie, ces hypothèses demeurent cependant à démontrer.

Une partie importante de cette thèse a concerné le rôle de la localisation cytoplasmique de cycline D1 dans le contrôle des mécanismes d'invasions et de migration des cellules de LCM. Nous avons utilisé un ensemble de modèles, à savoir des lignées cellulaires, des modèles animaux et nous nous sommes appuyés sur les informations cliniques de patients pour appuyer nos hypothèses. Suite à nos expériences, même si un niveau de preuve plus important est requis, nous pensons qu'il pourrait être intéressant de déterminer la localisation subcellulaire de cycline D1 au moment du diagnostic afin de proposer un traitement personnalisé par le KPT-330 pour les patients présentant une localisation cytoplasmique de cycline D1 seul ou en association avec les inhibiteurs du protéasome.

Les patients souffrant d'un LCM présentent des résistances spontanées ou acquises suite à une première ligne de chimiothérapie. Plusieurs mécanismes de résistances ont été décrit, nous rapportons ici qu'une diminution de l'activité du protéasome 26S pourrait être un mécanisme supplémentaire. Le développement d'une stratégie thérapeutique pour contrecarrer ce mécanisme, pourrait donc par conséquent être intéressant, car nous serions en

mesure de resensibiliser des tumeurs à des chimiothérapies conventionnelles et ainsi d'augmenter la réponse clinique des patients.

Les travaux préliminaires menés sur l'association entre cycline D1 et FUS demeurent à approfondir mais pourraient déboucher sur la mise en évidence d'un nouveau rôle de la cycline D1 en association à la protéine FUS dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Ces mécanismes de réparations sont cruciaux dans l'émergence de clones résistant aux thérapeutiques. Un ciblage de cette association pourrait permettre de lever certains mécanismes de résistance aux thérapies conventionnelles.

Bibliographie

1. © Institut National du Cancer (INCA). Les Données, Les cancers en France. 2015th ed. INCA, editor. 671 p.
2. García-garcía A, De Castillejo C, Méndez-Ferrer S. BMSCs and hematopoiesis. Immunol Lett. 2015;168(2):129–35.
3. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. CA Cancer J Clin. 2016;66:443–59.
4. © Haute Autorité de Santé. Guide ALD: Lymphomes non hodgkiniens de l'adulte. 2012th ed. HAS, editor. 48 p.
5. Karlin L, Coman T. Cahiers des ECN: Hématologie. In: Masson E, editor. 2009th ed. p. 88.
6. SIMON M. Les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes [Internet]. 2009 [cited 2017 Jul 10]. Available from: http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoides.html
7. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol. 2006;34(5):599–608.
8. Nancy B, Harris L, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994;84(5):1361–92.
9. NHLCP. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. Blood. 1997;89(11):3909–18.
10. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis BC, et al. Non-Hodgkin's Lymphomas, Clinical Practice Guidelines in Oncology - Version 4.2014. J Natl Compr Cancer Netw. 2014;12(9):916–46.
11. Monnerreau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. 2013th ed. INVS, editor. 85 p.
12. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2014;117(19):5019–33.
13. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. J Clin Oncol. 2014;32(27):3059–67.
14. Arch V, Sander B, Quintanilla-martinez L, Ott G, Xerri L, Kuzu I, et al. Mantle cell lymphoma — a spectrum from indolent to aggressive disease. Virchows Arch. 2015;468(3):245–57.
15. Hashmi AA, Hussain ZF, Faridi N, Khurshid A. Distribution of Ki67 proliferative indices among who subtypes of non-hodgkin's lymphoma: Association with other clinical parameters. Asian Pacific J Cancer Prev. 2014;15(20):8759–63.
16. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. J Clin

Invest. 2012;122(10):3416–23.
17. Jaspers A, Baron F, Bonnet C, B DP, Fassotte M., Beguin Y. Le Lymphome du manteau. Rev Med Liège. 2010;65(4):171–6.
18. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. Immunity [Internet]. 2000;13(1):15–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933391
19. Menter T, Dirnhofer S, Tzankov A. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. J Clin Pathol. 2015;68(6):473–8.
20. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baro C, Valera A, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. Haematologica. 2009;94(11):1555–62.
21. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell. 2003;3(2):185–97.
22. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Hoof A Van, Kluin-nelemans HC, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. Blood. 2008;111(2):558–66.
23. Shah BD, Martin P, Sotomayor EM. Mantle Cell Lymphoma: A Clinically Heterogeneous Disease in Need of Tailored Approaches. Cancer Control. 2012;19(3):227–35.
24. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: All oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. J Clin Oncol. 2005;23(26):6364–9.
25. Delfau-Larue M-H, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. Blood. 2015;126(5):604–12.
26. Kridel R, Meissner B, Rogic S, Boyle M, Telenius A, Woolcock B, et al. Plenary paper Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. Blood. 2012;119(9):1963–72.
27. Vegliante MC, Palomero J, Pérez-Galan P, Roué G, Castellano G, Navarro A, et al. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. Blood. 2013;121(12):2175–86.
28. Balsas P, Palomero J, Eguileor Á, Rodríguez ML, Vegliante MC, Planas-Rigol E, et al. Sox11 promotes tumor protective microenvironnement interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymhoma. Blood. 2017;130(4):501–13.
29. Durot E, Patey M, Luquet I, Gaillard B, Kolb B, Durot E, et al. An aggressive B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and CCND1 genes: a rare subtype of double-hit lymphoma An aggressive B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and CCND1 genes: a rare subtype of double-hit lymphoma. Leuk Lymphoma. 2012;8194(April):4–8.
30. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. Genes (Basel). 2017;8(116):1–23.
31. Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and

microarray analysis. Blood. 2007;109(12):5422–30.
32. Camacho E, Herna L, Herna S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. Blood. 2002;99(1):238–45.
33. Halldorsdottir A, Lundin A, Murray F, Mansouri L, Knuutila S, Sundström C, et al. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. Leukemia. 2011;25(12):1904–8.
34. Pinyol BM, Hernandez L, Cazorla M, B MB, Jares P, Fernandez PL, et al. Deletions and loss of expression of P16 and P21 genes are associated with agressive variants of mantle cell lymphomas. Blood. 1997;89(1):272–80.
35. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. Blood. 2006;108(5):1668–77.
36. Tabe Y, Jin L, Konopleva M, Shikami M, Kimura S, Andreeff M, et al. Class IA Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition Inhibits Cell Growth and Proliferation in Mantle Cell Lymphoma. Acta Haematol. 2013;131(1):59–69.
37. Camara-Clayette V, Lecluse Y, Schrader C, Klapper W, Vainchenker W, Hermine O, et al. The NF-kappaB pathway is rarely spontaneously activated in mantle cell lymphoma (MCL) cell lines and patient's samples. Eur J Cancer. 2014;50(1):159–69.
38. Inamdar AA, Goy A, Ayoub NM, Attia C, Oton L, Taruvai V, et al. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents. Oncotarget. 2016;7(30):48692–731.
39. Chiron D, Liberto M Di, Martin P, Huang X, Sharman J, Blecua P, et al. Cell Cycle Reprogramming for PI3K Inhibition Overrides Relapse-Specific C481S BTK Mutation Revealed by Longitudinal Functional Genomics in Mantle Cell Lymphoma. Cancer Discov 2014. 2014;46(10):3684–92.
40. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. Semin Cancer Biol. 2014;24:71–81.
41. Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. Semin Cancer Biol. 2014;24:23–32.
42. Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: Cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. Semin Cancer Biol. 2011;21(5):308–12.
43. Lwin T, Lin J, Choi YS, Zhang X, Moscinski LC, Wright KL, et al. Follicular dendritic cell dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell-adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. Blood. 2010;116(24):5228–36.
44. Chiron D, Bellanger C, Papin A, Tessoulin B, Dousset C, Maiga S, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128(24):2808–18.
45. Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2009;27(8):1209–13.

46. Sandoval-Sus JD, Sotomayor EM, Shah BD. Mantle Cell Lymphoma: Contemporary Diagnostic and Treatment Perspectives in the Age of Personalized Medicine. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2017;Epub.
47. Schulz H, Bohlius J, Skoetz N, Trelle S, Kober T, Reiser M, et al. Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(4):1–35.
48. Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Beà S, Hartmann E, Salaverria I, Hutter G, et al. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 10th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. Leuk Lymphoma. 2011;52(12):2226–36.
49. CNHIM. Thériaque [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 24]. Available from: www.theriaque.org/
50. Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Hoof A Van, Gisselbrecht C, Schmits R, et al. Early consolidation with Myeloablative radiochernotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle cell lymphoma. Blood. 2005;105(7):2677.
51. Yan F, Gopal A, Graf S. Targeted Drugs as Maintenance Therapy after Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Mantle Cell Lymphoma. Pharmaceuticals. 2017;10(28):1–11.
52. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2013;369(6):507–16.
53. Ysebaert L, Dil-huydy M-S. Thérapies ciblées contre la Bruton tyrosine kinase/phosphatidylinositol-3 kinase dans les leucémies lymphoïdes chroniques: quels modes d'action pour expliquer les réponses, les résistances, et les effets secondaires? Hématologie. 2015;21(2):117–26.
54. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, et al. Treatment of Older Patients with Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2012;367(6):520–31.
55. Gressin R, Caulet-Maugendre S, Deconinck E, Tournilhac O, Gyan E, Moles MP, et al. Evaluation of the (R)VAD+C regimen for the treatment of newly diagnosed mantle cell lymphoma. combined results of two prospective phase ii trials from the French GOELAMS group. Haematologica. 2010;95(8):1350–7.
56. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. Blood J. 2015;125(1):48–56.
57. Ansell SM, Tang H, Kurtin PJ, Koenig PA, Inwards DJ, Shah K, et al. Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: A phase 2 study. Lancet Oncol. 2011;12(4):361–8.
58. Trneny M, Lamy T, Walewski J, Belada D, Mayer J, Radford J, et al. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): A phase 2, randomised, multicentre trial. Lancet Oncol. 2016;17(3):319–31.
59. The Lymphoma Study Association. Lymphomes à cellules du manteau [Internet]. [cited 2017 Jul 10]. Available from: http://www.lysa-lymphoma.org/espace-professionnels/essais-cliniques/lcm/
60. Yang Q, Chen LS, Ha MJ, Do KA, Neelapu SS, Gandhi V. Idelalisib impacts cell growth

through inhibiting translation-regulatory mechanisms in mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res. 2017;23(1):181–92.
61. Andersen NS, Pedersen LB, Laurell A, Elonen E, Kolstad A, Boesen AM, et al. Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. J Clin Oncol. 2009;27(26):4365–70.
62. Cheminant M, Derrieux C, Touzart A, Schmit S, Grenier A, Trinquand A, et al. Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: An EU-MCL and LYSA study. Haematologica. 2016;101(3):336–45.
63. Leibniz-Institut DSMZ. DSMZ [Internet]. [cited 2017 Jul 18]. Available from: https://www.dsmz.de/home.html
64. Bosanquet A, Bell P, Rooney N. Effect of interleukin-2 on CD95 (Fas/APO-1) expression in fresh chronic lymphocytic leukaemia and mantle cell lymphoma cells: relationship to ex vivo chemoresponse. Anticancer Res. 1999;19(6):5329–34.
65. Jacobson C, Kopp N, Layer J V., Redd RA, Tschuri S, Haebe S, et al. HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128(21):2517–26.
66. Dhilly M, Guillouet S, Patin D, Fillesoye F, Abbas A, Gourand F, et al. 2-[18F]fludarabine, a novel positron emission tomography (PET) tracer for imaging lymphoma: A micro-PET study in murine models. Mol Imaging Biol. 2014;16(1):118–26.
67. Verner J, Trbusek M, Chovancova J, Jaskova Z, Moulis M, Folber F, et al. NOD/SCID IL2Rγ-null mouse xenograft model of human p53-mutated chronic lymphocytic leukemia and ATM-mutated mantle cell lymphoma using permanent cell lines. Leuk Lymphoma. 2015;56(February 2016):3198–206.
68. Carlo-Stella C, Di Nicola M, Turco MC, Cleris L, Lavazza C, Longoni P, et al. The anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody 1D09C3 activates the mitochondrial cell death pathway and exerts a potent antitumor activity in lymphoma-bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Cancer Res. 2006;66(3):1799–808.
69. Wang M, Zhang L, Han X, Yang J, Qian J, Hong S, et al. A severe combined immunodeficient-hu in vivo mouse model of human primary mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res. 2008;14(7):2154–60.
70. Iyengar S, Ariza-Mcnaughton L, Clear A, Taussig D, Auer R, Roe A, et al. Characteristics of human primary mantle cell lymphoma engraftment in NSG mice. Br J Haematol. 2016;173(1):165–9.
71. Zhao X, Lwin T, Silva A, Shah B, Fang B, Fu K, et al. Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. Nat Commun. 2017;8:14920–35.
72. Yakimchuk K, Hasni MS, Guan J, Chao MP, Sander B, Okret S. Inhibition of lymphoma vascularization and dissemination by estrogen receptor β agonists. Blood. 2014;123(13):2054–61.
73. Yakimchuk K, Jondal M, Okret S. Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies. Mol Cell Endocrinol. 2013;375(1–2):121–9.
74. Arlos MJ, Liang R, Hatat-fraile MM, Bragg LM, Zhou NY, Servos MR, et al. Photocatalytic decomposition of selected estrogens and their estrogenic activity by UV-LED irradiated TiO 2 immobilized on porous titanium sheets via thermal-chemical oxidation. J Hazard Mater. 2016;318:541–50.
75. Krust A, Green S, Argos P, Walter P, Bornert J, Chambon P. The chicken oestrogen

receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. EMBO J. 1986;5(5):891–7.
76. Le Grand A. Thèse d'université: Etude comparative de récepteurs aux œstrogènes: Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux œstrogènes et anti-œstrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein. Université de Bretagne-Sud; 2010.
77. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor β-isoform (ERβ) of the human estrogen receptor modulates ERα transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology. 1999;140(12):5566–78.
78. Schwabe JWR, Neuhaus D, Rhodes D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. Nature. 1990;348:458–61.
79. Pasqualini C, Guivarc D, Barnier J, Guibert B, Vincent J, Vernier P. Differential subcellular distribution and transcriptional activity of ΣE3 , ΣE4, and ΣE3-4 isoforms of the rat estrogen receptor α. Mol Endocrinol. 2001;15(6):894–908.
80. Wurtz J, Bourquet W, Renaud J, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. Nat Struct Biol. 1996;3(1):87–94.
81. Yang J, Singleton DW, Shaughnessy EA, Khan SA. Molecular and Cellular Endocrinology The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. Mol Cell Endocrinol. 2008;295(1–2):94–100.
82. Stygar D, Westlund P, Eriksson H, Sahlin L. Identification of wild type and variants of oestrogen receptors in polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;64(1):74–81.
83. Chandsawangbhuwana C, Baker ME. 3D models of human ERα and ERβ complexed with coumestrol. Steroids. 2014;80:37–43.
84. Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, Saunier EF, Herber CB, Cohen I, et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. Curr Opin Pharmacol. 2010;10(6):629–36.
85. Harris HA, Albert LEOM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, et al. Evaluation of an Estrogen Receptor- β Agonist in Animal Models of Human Disease. Endocrinology. 2003;144(10):4241–9.
86. Casimiro MC, Velasco-Velázquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. Expert Opin Investig Drugs. 2014;23(3):295–304.
87. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. Cell. 1995;82(4):621–30.
88. Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, et al. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. Nature. 1996;384:470–4.
89. Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, et al. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. Cancer Cell. 2003;4(6):451–61.
90. Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. Genomic Organization, Chromosomal Localization, and Independent Expression of Human Cyclin-D Genes. Genomics. 1992;13 (3):565–74.
91. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing

and cancer risk. Oncogene. 2006;25(11):1620–8.
92. Zwijsen RML, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJM, Bernards R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. Genes Dev. 1998;12(22):3488–98.
93. Howe D, Lynas C. The cyclin D1 alternative transcripts [a] and [b] are expressed in normal and malignant lymphocytes and their relative levels are influenced by the polymorphism at codon 241. Haematologica. 2001;86(6):563–9.
94. Protein Data Bank R. Crystal Structure of CDK4 in complex with a D-type cyclin [Internet]. [cited 2017 Jul 8]. Available from: http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2w9z
95. Benzeno S, Diehl JA. C-terminal sequences direct cyclin D1-CRM1 binding. J Biol Chem. 2004;279(53):56061–6.
96. Camus V, Miloudi H, Taly A, Sola B, Jardin F. XPO1 in B cell hematological malignancies: from recurrent somatic mutations to targeted therapy. J Hematol Oncol. 2017;10(1):47.
97. Guo Y, Yang K, Harwalkar J, Nye JM, Mason DR, Garrett MD, et al. Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. Oncogene. 2005;24(16):2599–612.
98. Karyopharm Therapeutics. Oral selinexor (KPT-330) [Internet]. [cited 2017 Aug 19]. Available from: https://www.karyopharm.com/pipeline/oral-selinexor-kpt-330/
99. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. Genes Dev. 2000;14(24):3102–14.
100. Witzel I-I, Koh LF, Perkins ND. Regulation of cyclin D1 gene expression. Biochem Soc Trans. 2010;38(1):217–22.
101. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. Endocrinology. 2004;145(12):5439–47.
102. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. Cell Signal. 2008;20(4):581–9.
103. Bracken CP, Wall SJ, Barré B, Panov KI, Ajuh PM, Perkins ND. Regulation of cyclin D1 RNA stability by SNIP1. Cancer Res. 2008;68(18):7621–8.
104. Fujii M, Lyakh LA, Bracken CP, Fukuoka J, Hayakawa M, Tsukiyama T, et al. SNIP1 Is a Candidate Modifier of the Transcriptional Activity of c-Myc on E Box-Dependent Target Genes. Mol Cell. 2006;24(5):771–83.
105. Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, Zimmermann Y, Hutter G, Weinkauf M, et al. 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene. Cell Cycle. 2009;8(21):3584–92.
106. Fukami-Kobayashi J, Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. Exp Cell Res. 1999;246(2):338–47.
107. Stacey DW. Three Observations That Have Changed Our Understanding of Cyclin D1 and p27 in Cell Cycle Control. Genes Cancer. 2010;1(12):1189–99.
108. Chen S, Jing Y, Kang X, Yang L, Wang D-L, Zhang W, et al. Histone H2B monoubiquitination is a critical epigenetic switch for the regulation of autophagy. Nucleic Acids Res. 2016;45(3):1144–58.
109. Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: Master

manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2014;1843(1):47–60.
110. Ciechanover A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2014;1843(1):86–96.
111. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1alpha interaction. Nature. 2003;423:550–5.
112. Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, et al. Cyclin D1–Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. Nature. 2014;510:547–51.
113. Zelivianski S, Cooley A, Kall R, Jeruss JS. Cyclin-dependent kinase 4-mediated phosphorylation inhibits Smad3 activity in cyclin D-overexpressing breast cancer cells. Mol Cancer Res. 2010;8(10):1375–87.
114. Kretschmer A, Moepert K, Dames S, Sternberger M, Kaufmann J, Klippel A. TGF-β receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. Oncogene. 1997;16(17):5353–62.
115. Brown NE, Jeselsohn R, Bihani T, Hu MG, Foltopoulou P, Kuperwasser C, et al. Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium. Cancer Res. 2012;72(24):6477–89.
116. Jirawatnotai S, Sittithumcharee G. Paradoxical roles of cyclin D1 in DNA stability. DNA Repair (Amst). 2016;42:56–62.
117. Knudsen KE, Cavenee WK, Arden KC. D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. Cancer Res. 1999;59(10):2297–301.
118. Zwijsen RML, Wientjens E, Klompmaker R, Van der Sman J, Bernards R, Michalides RJAM. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell. 1997;88(3):405–15.
119. Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C, et al. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. Mol Cell Biol. 2003;23(17):6159–73.
120. Adnane J, Shao Z, Robbins PD. Cyclin D1 Associates with the TBP-associated factor TAFII250 to regulate Sp1-mediated transcription. Oncogene. 1999;18(1):239–47.
121. Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, et al. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor γ-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. J Biol Chem. 2005;280(17):16934–41.
122. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, Sola B. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells. Cancer Res. 2011;71(5):1690–9.
123. Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, Quong AA, Katiyar S, Jiao X, et al. Cyclin D1 Determines Mitochondrial Function In Vivo. Mol Cell Biol. 2006;26(14):5449–69.
124. Pestell RG. New Roles of Cyclin D1. Am J Pathol. 2013;183(1):3–9.
125. Lin DI, Barbash O, Kumar KGS, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJJP, et al. Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin D1 by the SCFFBX4-αB Crystallin Complex. Mol Cell. 2006;24(3):355–66.
126. Berardi P, Meyyappan M, Riabowol KT. A novel transcriptional inhibitory element differentially regulates the cyclin D1 gene in senescent cells. J Biol Chem. 2003;278(9):7510–9.

127. Pontano LL, Aggarwal P, Barbash O, Brown EJ, Bassing CH, Diehl JA. Genotoxic stress-induced cyclin D1 phosphorylation and proteolysis are required for genomic stability. Mol Cell Biol. 2008;28(23):7245–58.
128. Santra MK, Wajapeyee N, Green MR. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. Nature. 2009;459(7247):722–5.
129. Casimiro MC, Crosariol M, Loro E, Ertel A, Zuoren Yu, Dampier W, et al. ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. J Clin Invest. 2012;122(3):833–43.
130. Jirawatnotai S, Hu Y, Livingston DM, Sicinski P. Proteomic Identification of a Direct Role for Cyclin D1 in DNA Damage Repair. Cancer Res. 2012;72(17):4289–94.
131. Li Z, Jiao X, Wang C, Ju X, Lu Y, Yuan L, et al. Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27KIP1. Cancer Res. 2006;66(20):9986–94.
132. Li Z, Wang C, Jiao X, Lu Y, Fu M, Quong AA, et al. Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. Mol Cell Biol. 2006;26(11):4240–56.
133. Dai M, Al-Odaini A a, Fils-Aimé N, Villatoro M a, Guo J, Arakelian A, et al. Cyclin D1 cooperates with p21 to regulate TGFβ-mediated breast cancer cell migration and tumor local invasion. Breast Cancer Res. 2013;15(3):3246–61.
134. Bakhoum SF, Compton D a. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. J Clin Invest. 2012;122(4):1138–43.
135. Nelsen CJ, Kuriyama R, Hirsch B, Negron VC, Lingle WL, Goggin MM, et al. Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. J Biol Chem. 2005;280(1):768–76.
136. Pontano LL, Aggarwal P, Barbash O, Brown EJ, Bassing CH, Diehl JA. Genotoxic Stress-Induced Cyclin D1 Phosphorylation and Proteolysis Are Required for Genomic Stability. 2008;28(23):7245–58.
137. Roué G, Pichereau V, Lincet H, Colomer D, Sola B. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. Oncogene. 2008;27(2008):4909–20.
138. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. Cell Res. 2014;24(1):9–23.
139. Casimiro MC, Di Sante G, Di Rocco A, Loro E, Pupo C, Pestell T, et al. Cyclin D1 restrains oncogene-induced autophagy by regulating the AMPK-LKB1 signaling axis. Cancer Res. 2017;77(13):3391–405.
140. Gan L, Liu P, Lu H, Chen S, Yang J, McCarthy JB, et al. Cyclin D1 promotes anchorage-independent cell survival by inhibiting FOXO-mediated anoikis. Cell Death Differ. 2009;16(10):1408–17.
141. Tchakarska G, Le Lan-Leguen A, Roth L, Sola B. The targeting of the sole cyclin D1 is not adequate for mantle cell lymphoma and myeloma therapies. Haematologica. 2009;94(12):1781–2.
142. Beltran E, Fresquet V, Martinez-Useros J, Richter-Larrea JA, Sagardoy A, Sesma I, et al. A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(30):12461–6.
143. Moros A, Bustany S, Cahu J, Saborit-Villarroya I, Martínez A, Colomer D, et al. Antitumoral activity of lenalidomide in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphomainvolves

the destabilization of cyclin D1/p27KIP1 Complexes. Clin Cancer Res. 2014;20(2):393–403.
144. Kinsella TM, Nolan GP. Episomal vectors rapidly and stably produce recombinant retrovirus. Hum Gene Ther. 1996;7(12):1405–13.
145. Bosch R, Dieguez-gonzalez R, Virtudes Cèspedes M, Parreno M, Angel-Pavon M, Granena A, et al. A novel inhibitor of focal adhesion signaling induces caspase-independent cell death in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2011;118(16):4411–21.
146. Antoniou MN, Skipper KA, Anakok O. Optimizing retroviral gene expression for effective therapies. Hum Gene Ther. 2013;374(April):363–74.
147. Swainson L, Mongellaz C, Rita V, Adjali O, Taylor N. Innate Immunity. Methods in. Vivier JEE, editor. 2008. 301-320 p.
148. Oinonen R, Franssila K, Elonen E. Central nervous system involvement in patients with mantle cell lymphoma. Ann Hematol. 1999;78:145–9.
149. Mackenzie IRA, Neumann M. FET proteins in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. 2012 Jun;1462:40–3.
150. Tan AY, Riley TR, Coady T, Bussemaker HJ, Manley JL. TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(16):6030–5.
151. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, et al. FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. Exp Hematol. 2010;38(8):696–706.
152. Kai M. Roles of RNA-Binding Proteins in DNA Damage Response. Int J Mol Sci. 2016;17(310):1–9.
153. Helleday T, Loc J, Gent DC van, Engelwardc BP. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair (Amst). 2007;6(7):923–35.
154. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet. 2001;27(3):247–54.
155. Jackson S, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009;461(7267):1071–8.
156. Mazumder TH, Nath S, Nath N, Kumar M. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Prognosis using molecular approach. Cent Eur J Biol. 2014;9(6):593–613.
157. Bustany S, Cahu J, Guardiola P, Sola B. Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. BMC Cancer. 2015;15(1):262–74.
158. Ladikou E-E, Kassi E. The emerging role of estrogen in B cell malignancies. Leuk Lymphoma. 2017;58(September):528–39.
159. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation : roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Mol Cancer. 2007;16(1):1–16.
160. Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F, et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. Nature. 2011;474:230–4.
161. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, et al. Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. J Biol Chem. 2003;278(32):30339–47.
162. Fusté NP, Fernández-hernández R, Cemeli T, Pedraza N, Rafel M, Torres-rosell J, et al.

Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell spreading , invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. Nat Commun. 2016;7:11581.
163. Zhong Z, Yeow WS, Zou C, Wassell R, Wang C, Pestell RG, et al. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. Cancer Res. 2010;70(5):2105–14.
164. Gravina GL, Tortoreto M, Mancini A, Addis A, Di Cesare E, Lenzi A, et al. XPO1/CRM1-selective inhibitors of nuclear export (SINE) reduce tumor spreading and improve overall survival in preclinical models of prostate cancer (PCa). J Hematol Oncol. 2014;7(1):46.
165. Tabe Y, Kojima K, Yamamoto S, Sekihara K, Matsushita H, Davis RE, et al. Ribosomal biogenesis and translational flux inhibition by the selective inhibitor of nuclear export (sine) XPO1 antagonist KPT-185. PLoS One. 2015;10(9):1–19.
166. Turner JG, Dawson JL, Grant S, Shain KH, Dalton WS, Dai Y, et al. Treatment of acquired drug resistance in multiple myeloma by combination therapy with XPO1 and topoisomerase II inhibitors. J Hematol Oncol. 2016;9(1):73.
167. Mohanty A, Sandoval N, Das M, Pillai R, Chen L, Chen RW, et al. CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. Oncotarget. 2016;7(45).
168. Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chun Chan F, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-κB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. Nat Med. 2014;20(1):87–92.
169. Saba NS, Liu D, Herman SEM, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- k B activation in mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128(1):82–93.
170. Ma J, Lu P, Guo A, Cheng S, Zong H, Martin P, et al. Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. Br J Haematol. 2014;166(6):849–61.
171. Acosta-Alvear D, Cho MY, Wild T, Buchholz TJ, Lerner AG, Simakova O, et al. Paradoxical resistance of multiple myeloma to proteasome inhibitors by decreased levels of 19S proteasomal subunits. Elife. 2015;4(September):1–19.
172. Meissner B, Kridel R, Lim RS, Rogic S, Tse K, Scott DW, et al. The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. Blood. 2013;121(16):3161–5.
173. Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. J Biol Chem. 2013;288(34):24731–41.
174. Wang W-Y, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, Jimenez JC, et al. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. Nat Neurosci. 2013;16(10):1383–91.
175. Bekker-Jensen S, Mailand N. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. DNA Repair (Amst). 2010;9(12):1219–28.
176. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 2004;18(22):2699–711.

Annexe 1

Échelle de statut de performance-ECOG

(Échelle de statut de performance-ECOG)

- ☐ **0.** Patient entièrement actif, capable d'effectuer les mêmes activités pré-morbides sans restriction
- ☐ **1.** Patient restreint dans ses activités physiques, mais ambulatoires et capables d'effectuer des activités légères ou sédentaires, par ex. : travaux ménagers légers ou tâches administratives
- ☐ **2.** Patient ambulatoire et capable de s'occuper de lui, mais incapable d'effectuer des activités. Debout > 50% de la journée
- ☐ **3.** Patient capable de soins limités, alité ou au fauteuil > 50% de la journée
- ☐ **4.** Patient complètement handicapé, ne pouvant s'occuper de lui. Totalement alité ou confiné au fauteuil

Annexe 2

Longueur d'onde d'utilisation des différents fluorophores utilisés en cytométrie

Fluorophore	Absorption (nm)	Emission (nm)
FITC	490	525
PE	565	573
PeCy7	565	767
PerCPCy5.5	482	676
APC	650	661
Alexa 700	696	719
Pacific blue	410	455
V500	405	510

Annexe 3

Published16 September 2015

Agonists of estrogen receptor β have limited anti-myeloma activity

Martin Fidalgo, Khaoula Ben Younes, Simon Body, Fatma Ben Aïssa-Fennira, Benoît Haelewyn, Brigitte Sola

Yakimchuk et al's reported that the activation of estrogen receptor (ER) β by selective agonists inhibits the proliferation of B lymphoma cells *in vivo*.[1] We previously reported that myeloma cells express both types (α and β) of ERs.[2] We hypothesized that the activation of ERβ by selective agonists could be efficient for impairing myeloma growth. We studied *in vitro* the effects of diarylpropionitrile (DPN) and 7-ethinyl-2-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-5-benzoxazolol (ERB-041) on the RPMI8226 MM cell line expressing GFP and luciferase protein.[3] DPN had no significant effect. ERB-041 showed a dose-dependent inhibition of proliferation for low concentrations and short treatment. For higher concentrations or longer times of treatment, ERB-041 had a paradoxical proliferative effect (Figure 1A). In those conditions, ERβ sites were probably all occupied and ERB-041 bound ERα leading to an enhanced proliferation. PPT (1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole), a specific ERα agonist, enhanced RPMI8226-GFP-Luc cells proliferation (Figure 1A) demonstrating that ERβ and ERα were fully functional.

RPMI8226-GFP-Luc cells were injected i.v. in NOD/SCID mice. Fifteen days later, a first group received the vehicle, and a second one, ERB-041. Mice were analyzed weekly. Tumor localization and growth were monitored by bioluminescence imaging (Figure 1B,C). Tumors engrafted into four out of five mice in the control group, two out of five mice in the ERB-041-treated group. ERβ agonists were efficient for limiting cell proliferation of tumor cells circulating in the blood flow and impairing their homing. However, tumor growth was similar in the two groups (Figure 1D). ERβ agonists had limited effects on tumors implanted in their niche. ERβ are present in endothelial and immune cells of the medullar microenvironement probably diluting drug effects.

The use of ERβ agonists seem to be difficult to standardize because of the presence of both ERα and ERβ in MM cells and the complex balance between pro-and anti-proliferative effects of the molecules.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from *Ligue Nationale contre le Cancer - Comité de la Manche* (to B.S.).

Correspondence: Brigitte Sola, EA 4652, UFR de médecine, CHU Côte de Nacre, 14032 Caen Cedex, France. Tel. + 33 2 3106 8210. Fax +33 2 3106 8224. E-mail: brigitte.sola@unicaen.fr.

Figure 1. ERB-041 inhibits the proliferation of MM cells *in vitro* and impairs tumor engraftment

A. RPMI 8226-GFP-Luc cells were cultured three days before the treatments in RPMI 1640 medium without phenol red supplemented with charcoal-treated fetal calf serum. Cells were seeded in 96-well plates (2×10^4 cells per well) and treated with vehicle (0.01% DMSO) or the indicated concentrations of DPN, ERB-041 or PPT for 24 h (left and right parts) or for 24-72 h with 10 nM ERB-041 (middle part). Cell proliferation was assessed by the CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega. The absorbance of the cell line treated with each drug is expressed relative to that of the cell line treated with vehicle (defined as 100%). For each set of culture conditions, the mean of triplicate to quintuplicate ratios is indicated on the graph, together with the SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ with the Student's *t* test. Experiments have been done two times with similar results. **B**. *In vivo* experiments were conducted in accordance with the recommendations of

EEC (86/609/CEE). They were approved by the Animal Experimental Ethics Committee of our institution (CENOMEXA agreement N109-11-12/32/11-15). We used the RPMI8226-Luc-GFP cell model described previously.[3] Six-week old male NOD/SCID mice were injected in the caudal vein with 5 x 10^6 cells. Fifteen days later, mice received either vehicle (0.1% DMSO, n= 5) or were injected daily, five days/week, i.p. with 5 mg/kg ERB-041 (n= 5) until the end of the experiment. Both treatments were well tolerated and did not induce any weight loss. For bioluminescence imaging (BLI), mice were injected i.p. with 75 mg/kg of D-luciferine and then analyzed with a PhotonIMAGER™ (Biospace lab). Mice were imaged at successive time points and timeline of bioluminescent signals in individual mouse is presented. The mouse #301 harbors a subcutaneous tumor at the site of injection probably due to cells leaking out of the vein. Tumors were localized in the bone marrow of femur (mice #302, 303, and 306), rachis (mouse #310), skull (mouse #305). **C**. Left femur (for a negative control) and skull of mouse #305 were processed and analyzed by HES and immunohistochemistry for CD138 staining. Images were obtained with a x100 magnification. **D**. Ventral plus dorsal luciferase activities were quantified with the M3Vision software. BLI of each individual mouse is reported on the graph as a function of time; blue curves corresponded to ERB-041 group, and red curves to vehicle group. The mouse #301 bearing a huge tumor was sacrificed at day 45 for ethical reasons.

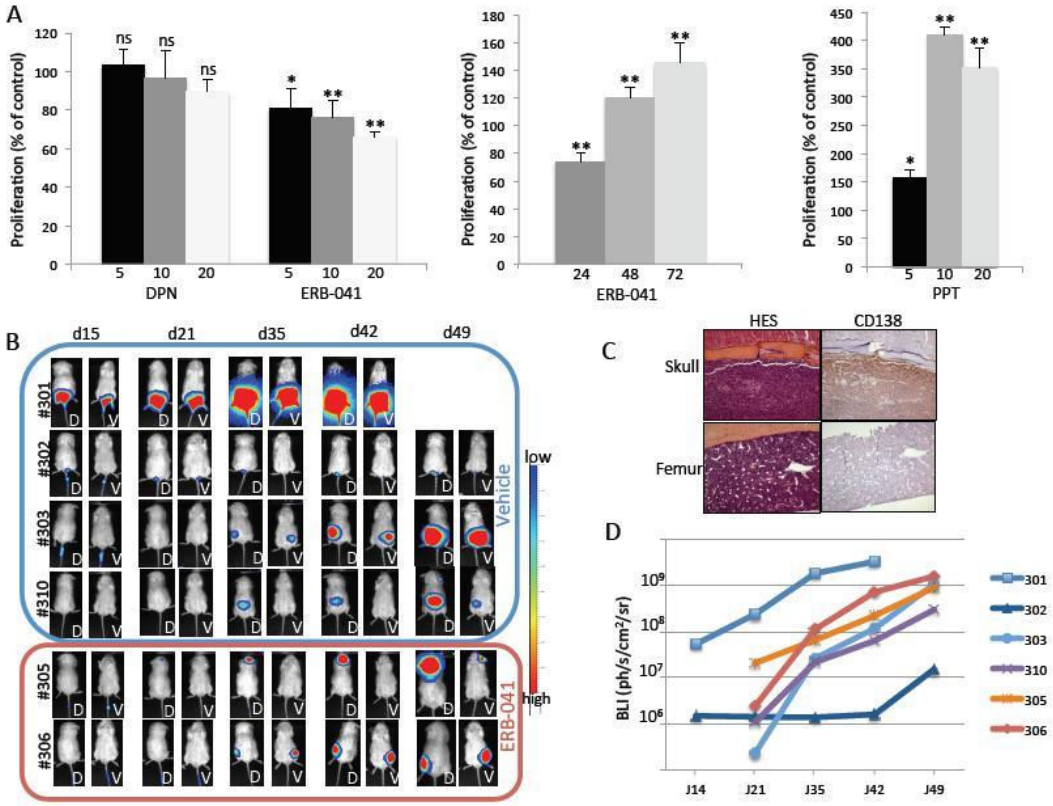
References

1. Yakimchuk K, Hasni MS, Guan J, et al. Inhibition of lymphoma vascularization and dissemination by estrogen receptor β agonists. *Blood*. 2014; 123(13): 2054–2061.

2. Gauduchon J, Gouilleux F, Maillard SB, et al. 4-hydroxytamoxifen inhibits proliferation of multiple myeloma cells in vitro through down-regulation of c-Myc, up-regulationof p27. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(6): 2345–2354.

3. Rozemuller H, van der Spek E, Bogers-Boer LH, et al. A bioluminescence imaging based in vivo model for preclinical testing of novel cellular immunotherapy strategies to improve the graft-versus-myeloma effect. *Haematologica*. 2008; 93(7): 1049–1057

http://www.bloodjournal.org/content/123/13/2054



Résumé :

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est une hémopathie maligne B mature, appartenant à la famille des lymphomes non hodgkiniens. Le LCM est caractérisé par la translocation t(11;14)(q13;q32) qui provoque une expression aberrante de cycline D1. C'est une pathologie rare mais à haut risque de rechute, et qui reste le plus souvent incurable suite à l'apparition de clones chimiorésistants. L'acquisition de résistance est intimement liée aux interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Afin de mimer de la manière la plus pertinente possible ces interactions, nous avons mis en place un modèle murin de xénogreffe en utilisant les lignées cellulaires de LCM JeKo1, REC1, Z138 et Granta-519 que nous avons modifiées afin qu'elles expriment un fluorophore (GFP ou m-cherry) et/ou le gène codant pour la luciférase. Après injection aux souris du substrat de la luciférase, la luciférine, nous sommes en mesure de suivre au cours du temps la progression tumorale. Nous pouvons également évaluer le degré d'infiltration tumorale dans la moelle osseuse, la rate, le cerveau et le sang après euthanasie des animaux, par des techniques de cytométrie en flux et d'immunocytochimie. Ce modèle nous a permis de montrer l'intérêt thérapeutique d'un inhibiteur de l'exportine 1 (XPO1) : le KPT 330 (ou selinexor) qui est capable de contenir cycline D1 uniquement au niveau nucléaire. Nous avons montré que la localisation subcellulaire de cycline D1, est retrouvée majoritairement cytoplasmique dans certaines lignées cellulaires de LCM (2/7) et chez un certain nombre de patients (6/42, 14%), et est associée à un fort potentiel d'invasion, de migration et à un phénotype agressif. Par ailleurs, grâce à ce modèle, nous avons pu objectiver le manque d'efficacité *in vivo* d'agonistes aux récepteurs aux œstrogènes de type β (ER β). Ces récepteurs, présents sur les lymphocytes B étaient supposés inhiber la prolifération cellulaire et provoquer la mort des cellules par apoptose. L'utilisation de deux agonistes des ER β, le diarylpropionitrile (DPN) et l'ERB-041 a montré une absence d'effet de ces molécules, lorsque les cellules tumorales sont au contact de leur microenvironnement. D'autre part, afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux chimiothérapies, nous avons étudié la résistance de la lignée cellulaire REC-1 traitée par des agents génotoxiques. Nous avons montré que cette lignée présentait une anomalie de dégradation de cycline D1 associée à une activité diminuée du protéasome 26S. Enfin, nous avons montré dans des travaux préliminaires que la protéine *fused in sarcoma* (FUS) pourrait, lorsqu'elle est associée à cycline D1, être capable de réguler les voies de réparation des dommages à l'ADN. Des anomalies de ces voies induisent une grande instabilité génétique responsable de l'échappement des tumeurs aux traitements, le ciblage de FUS pourrait par conséquent présenter un intérêt thérapeutique.

Pris dans leur ensemble, ces résultats permettent de renforcer ou d'infirmer l'intérêt de certaines cibles thérapeutiques dans l'espoir de pouvoir continuer à améliorer la prise en charge des patients. Ils fournissent également un outil pour l'évaluation de nouvelles molécules dans un modèle murin prenant en compte les interactions entre la cellule tumorale et son microenvironnement.