



HAL
open science

Etude du rôle de MYD88 et des voies NF- κ B dans l'émergence des lymphomes B

Lilian Roland

► **To cite this version:**

Lilian Roland. Etude du rôle de MYD88 et des voies NF- κ B dans l'émergence des lymphomes B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0014 . tel-03191615

HAL Id: tel-03191615

<https://theses.hal.science/tel-03191615>

Submitted on 7 Apr 2021

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.



UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED615)

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

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Mercredi 24 mars 2021

Etude du rôle de MYD88 et des voies NF- κ B dans l'émergence des lymphomes B

Thèse dirigée par

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

Jury de thèse

Président : Pr Michel Cogné (PU-PH, INSERM U1236, Rennes)
Rapporteurs : Pr Camille Laurent (PU-PH, INSERM U1037, Toulouse)
Pr Florence Nguyen Khac (PU-PH, INSERM U1138, Paris)
Examineurs : Pr Stéphanie Poulain (PU-PH, INSERM U1277, Lille)
Dr Karl Balabanian (DR, INSERM U1160, Paris)

En hommage à Papert Bébi, génie incompris



Remerciements

Je remercie le professeur Michel Cogné de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Un grand merci à Jean Feuillard, à Christelle Vincent-Fabert et à Chantal Jayat Vignoles de m'avoir accepté et encadré pendant un peu plus de 3 ans sur ce sujet de thèse qui m'a passionné. Merci pour leur confiance, leur aide, leurs conseils et leur disponibilité.

Merci aux membres du jury, Camille Laurent et Florence Nguyen Khac d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci à Stéphanie Poulain et Karl Balabanian d'avoir accepté d'être examinateurs et merci à Michel Cogné d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Merci à Jean Feuillard qui a su me transmettre une très grande quantité de connaissances dans la recherche sur les lymphomes B, ainsi qu'en bio-informatique notamment sur le logiciel R.

Merci à Christelle Vincent-Fabert qui m'a aussi beaucoup transmis, et grâce à qui j'ai pu énormément progresser en théorie comme en pratique. Merci pour ton humilité, ton écoute et ta disponibilité sans faille.

Merci à Chantal Jayat Vignoles, avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant un peu plus d'un an, et qui a su répondre à mes interrogations, tant à propos de la science que de l'enseignement.

Merci à Catherine avec qui j'ai apprécié travailler sur notre sujet commun.

Merci à Anne qui a commencé son doctorat en même temps que moi et avec qui j'ai pu développer une connivence certaine.

Merci à mes chères collègues de bureau Israa, Jennifer, Stecy et Léa (c'était un grand bureau) avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments au labo, où vous avez apporté gaieté et légèreté.

Merci à Bastien, Audrey et Morgane pour ces bons moments partagés, notamment lors de ces dîners de haute qualité gastronomique qui me manquent déjà.

Merci à Hussein A, pour ta grande sagesse lors de ces discussions pertinentes tant sur l'après thèse que sur la maçonnerie et le bricolage.

Merci à mon ancien bureau de l'association des doctorants pluridisciplinaires de Limoges, Cédric, Céline, Clément, Clotilde, Lucie, Anne, Andréa et Elodie, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler dans le but de réunir les doctorants de l'ED614 et 615 au cours d'événements divers.

Merci à Iman et Zeinab pour leurs précieux conseils techniques et leur incroyable gentillesse.

Merci à Claire, Robin, Sophie, Nathalie, Christelle O, Stéphanie, ainsi qu'à tous les autres membres des deux équipes de l'UMR CNRS 7276 / INSERM1262

Un grand merci à Mélanie, mes frères Anthony et Sacha et bien sûr mes parents, qui ont su m'aider quand il le fallait et sans qui, les épreuves pendant ces 3 ans, auraient été bien plus difficiles.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Abréviations

A

A20/TNFAIP3 : TNF alpha induced protein 3
ABC : Cellules B activées
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
AID : Cytidine désaminase induisant l'activation
AKT : Protein kinase B Alpha
ANK : Domaine de répétition ankyrine
APRIL : A proliferation-inducing ligand
ARN : Acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin
ARNm : ARN messenger
ARNsb : ARN simple brin

B

B Blast : Lymphocyte B Blastique
BAFF : B cell-activating factor
BAFFR : B cell-activating factor receptor
BCL : Protéine "B cell CLL/lymphoma"
BCMA : B Cell Maturation Antigen
BCR : Récepteur spécifique des lymphocytes B
BIRC/cIAP : Baculoviral IAP Repeat Containing
BL : Lymphome de Burkitt
BLNK : B cell linker protein
Breg : Lymphocyte B régulateur
BTK : Burton tyrosine kinase

C

CARMA/CARD : Caspase recruitment domain family member
CB : Centroblast
CC : Centrocyte
CC1/CC2 : Domaine coiled coil
CD : Cellule dendritique
CD4 : Cluster de différenciation 4
CD8 : Cluster de différenciation 8
CDF : Cellule dendritique folliculaire
CDR : Complémentarity determining regions
CG : Centre germinatif
cIAP/BIRC : Baculoviral IAP Repeat Containing
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COO : Cell of origin
CPA : Cellule présentatrice de l'antigène
Cre : Cre-recombinase
CSF : Colony stimulating factor
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSR : Class switch recombination
CXC : C-X-C motif chemokine
CXCL : C-X-C motif chemokine ligand
CXCR : C-X-C chemokine receptor

D

CYLD : CYLD Lysine 63 Deubiquitinase
DAG : Diacylglycerol
DD : Domaine de dimérisation ou death domain
DHR : Domaine d'homologie REL
DLBCL : Lymphome diffus à grandes cellules B
DLP-B : Désordre lymphoprolifératif B

E

EBV : Virus d'Epstein Barr
EDA-A1 : Ectodysplasin A1
EDAR : Ectodysplasin A receptor
EDARADD : EDAR associated death domain
EF-TD : Extra-folliculaire T dépendante
EF-TI : Extra-folliculaire T indépendante
ES : Cellule souche embryonnaire

F

Fab : Fragment de liaison à l'antigène
Fc : Fragment cristallisable
Fn14 : Fibroblast growth factor inducible 14
FO : Folliculaire

G

GCB : Cellules du CG

H

HCK : Kinase des cellules hématopoïétiques
HHV8 : Herpes virus de type 8
HLA-G : CMH de classe 1 non classique
HOIL : Heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1
HOIP : HOIL1-interacting protein
HTLV-1 : Virus T lymphotrophe humain de type 1
HVEML : Herpesvirus Entry Mediator Ligand

I

ID : Domaine intermédiaire
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IgC : Ségment constant de l'immunoglobuline
IgD : Ségment de diversité de l'immunoglobuline
IgH : Chaîne lourde de l'immunoglobuline
IgJ : Ségment de jonction de l'immunoglobuline
IgL : Chaîne légère de l'immunoglobuline
IgV : Ségment variable de l'immunoglobuline
IKK : kinase ciblant les IκB
IL : Interleukine
IL-1R : Récepteur à l'IL1
IP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate
IRAK : IL-1R associated kinase
IRF : Interféron-régulatory factor
ITAM : Motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine
Itch : Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase
ITK : IL-2 inducible T cell kinase
IκB : Inhibiteur du complexe NF-κB

J

JAK : Janus kinase
JNK : Jun kinase

K

KO : Knock out

L

LAT : Linker of activated T cells

LCM : Lymphome des cellules du manteau

LF : Lymphome folliculaire

LFt : Lymphome folliculaire transformé

LH : Lymphomes hodgkinien

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LLP : Lymphome Lymphoplasmocytaire

LNH : Lymphomes non hodgkinien

Loci : Plusieurs locus

Locus : Localisation précise d'un gène sur un chromosome

LPS : Lymphome primitif des séreuses

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Région riche en leucines

LT : Lymphocyte T

LTA : Lymphotoxin Alpha

LTF : Lymphocyte T folliculaire

LTP : DLBCL testiculaire primitif

LTβR : Lymphotoxin Beta Receptor

LUBAC : Complexe d'assemblage de chaîne d'ubiquitine linéaire

LZ : Leucine zipper

LZM : Lymphome de la zone marginale

LZMS : Lymphome de la zone marginale splénique

M

MAL : MyD88 adaptor-like

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MALT1 : MALT1 Paracaspase

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MD2 : Myeloid differentiation factor-2

MGUS : Gammopathie monoclonale à de signification indéterminée

MM : Myélome multiple

MW : Macroglobulinémie de Waldenström

MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88

N

NBD : Domaine de liaison de Némo

NF-κB : Nuclear Factor Kappa B

NHEJ : Non homologous end-joinind

NIK : NF-κB-inducing kinase

NK : Natural killer

NLRs : Leucine-rich repeats

NLS : Nuclear localization signal

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPGL : Osteoprotegerin ligand

P

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

PEST : Domaine proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

PKC : Protéine kinase C

PLC : Progéniteur lymphoïde commun

PMC : Progéniteur myéloïde comun

PRRs : Pattern-recognition receptors

PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog

PTLD : Lymphome post-transplantation

R

RAG : Recombinaison-activating genes

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RF : Reading Frame

RIPK/RIP : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase

RLR : Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors

RNF : Ring Finger Protein

RSS : Séquence signal de recombinaison

S

SARM : Sterile α -motif and armadillo motif-containing protein

SCL : Substitut de chaîne légère

SHARPIN : SHANK associated RH domain interacting protein

SHM : Somatic hypermutation

SLP : SH2 domain containing leukocyte protein

SNC : DLBCL du système nerveux centrale

T

TAB : TAK-Binding Protein

TACI : Transmembrane activator and CAML interactor

TAD : Domaine de transactivation

TAK : TGF β -activated kinase

TAX1BP1 : Tax1 binding protein 1

TCR : Récepteur spécifique des lymphocytes T

TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase

TES1 : Transformation effector site 1

TIR : Domaine Toll-IL-1R

TJ : DLBCL cutané de type jambe

TLR : Toll like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TNFAIP3/A20 : TNF alpha induced protein 3

TNFRSF : Tumor necrosis factor receptor superfamily member

TRAF : TNF receptor associated factor

TRAM : Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β -related adaptor molecule

Treg : Lymphocyte T régulateur

TRIF : Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β

TWEAK : TNF-Related WEAK Inducer Of Apoptosis

U

Ub : Poly-ubiquitination

Ubc13 : Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2N (Homologous To Yeast UBC13)

Uev1A : Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1

V

VDJ : Segments IgV, IgD, IgJ

VHC : Virus de l'hépatite C

X

XPB1 : X-Box Binding Protein 1

XEDAR : X-Linked Ectodysplasin-A2 Receptor

Z

ZAP : Zeta-chain-associated protein kinase

ZM : Zone marginale

Table des matières

I- Introduction	1
I.1. Le sang	1
I.2. La réponse immunitaire innée dite non spécifique	2
I.3. La réponse immunitaire adaptative dite spécifique	2
I.3.1. La reconnaissance du corps étranger	2
I.3.1.1. Le BCR	4
I.3.1.2. Structure des Ig	4
I.3.1.3. Le TCR et le CMH	7
I.3.2. Quelques rappels sur la réponse à médiation cellulaire	8
I.3.3. La réponse à médiation humorale : La cellule B	11
I.3.3.1. Différenciation des cellules B dans la moelle osseuse	13
I.3.3.1.1. CSH, PMP et PLC	13
I.3.3.1.2. Stade Pré-BI (Pré-Pro-B + Pro-B)	13
I.3.3.1.3. Stade Grande Pré-BII (Pré-B précoce)	16
I.3.3.1.4. Stade Petite Pré-BII (Pré-B tardif)	18
I.3.3.1.5. Stade B immature	19
I.3.3.2. Différenciation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires	20
I.3.3.2.1. Stade B de transition (T1-T2-T3)	20
I.3.3.2.2. Lymphocytes B-1a et B-1b	21
I.3.3.2.3. Lymphocyte B mature naïf	21
I.3.3.2.4. Lymphocytes B-FO, B-Blast	22
I.3.3.2.5. Lymphocytes B du centre germinatif (Centroblaste et Centrocytes)	25
I.3.3.2.6. Lymphocyte B mémoire et B-ZM	27
I.3.3.2.7. Plasmocytes	27
I.4. Les lymphocytes de la régulation de la réponse immunitaire	28
I.4.1. Les lymphocytes B régulateurs	28
I.4.2. Les lymphocytes T régulateurs	29
I.5. Les grands principes de la lymphomagénèse B	32
I.5.1. Principes de classification des lymphomes B non Hodgkinien	32
I.5.2. Les grands mécanismes de la transformation de la cellule B	33
I.5.2.1. Evènements liés à la maturation de l'Ig	33
I.5.2.1.1. Altérations génétiques lors de la recombinaison VDJ : l'exemple de BCL-2	34

1.5.2.1.2. Altérations génétiques lors de la CSR : l'exemple de c-MYC.....	35
1.5.2.1.3. Altérations génétiques lors de la SHM : l'exemple de BCL-6.....	36
1.5.2.2. Evènements non liés à la maturation de l'Ig.....	37
1.5.2.2.1. Altérations génétiques hors SHM.....	37
1.5.2.2.2. Microenvironnement favorable.....	38
1.5.2.3. Evènements liés à la transformation en lymphome agressif : la synergie entre les oncogènes.....	44
I.6. La protéine MYD88.....	46
1.6.1. Les récepteurs recrutant MYD88.....	46
1.6.2. Mutations de MYD88 dans les lymphomes.....	49
I.7. Le facteur de transcription NF-κB.....	53
1.7.1. Le complexe NF-κB.....	53
1.7.2. Les récepteurs activant NF-κB.....	58
1.7.2.1. Les récepteurs principalement associés à l'activation de la voie canonique de NF-κB.....	58
1.7.2.1.1. TCR et BCR.....	58
1.7.2.1.2. TLR et IL-1R.....	60
1.7.2.1.3. TNFR1.....	62
1.7.2.1.4. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	63
1.7.2.1.5. LMP1.....	65
1.7.2.1.6. EDAR, XEDAR.....	66
1.7.2.1.7. CD30.....	67
1.7.2.2. Les récepteurs principalement associés à l'activation de la voie non canonique de NF-κB.....	67
1.7.2.2.1. CD40, RANK, BCMA, TACI et Fn14.....	67
1.7.2.2.2. LTβR et BAFFR.....	69
1.7.3. Les modèles murins permettant l'étude des protéines des voies NF-κB.....	72
1.7.3.1. Modèles d'étude des sous unités de NF-κB, des IκB et des IκB kinases.....	75
1.7.3.2. Modèles d'étude des protéines principalement activatrices de la voie canonique de NF-κB.....	77
1.7.3.3. Modèles d'étude des protéines principalement activatrices de la voie non-canonique de NF-κB.....	80
1.7.3.4. Modèles d'étude des protéines activatrices de la voie classique et alternative de NF-κB.....	80
1.7.3.5. Modèles d'étude pour les protéines aberrantes impactant les voies NF-κB dans les lymphomes B.....	86

II- Objectifs.....	105
III- Résultats	107
III.1. Caractérisation d'un modèle murin développant un lymphome proche de la MW 107	
III.1.1. Synthèse de l'article	107
III.1.2. Article	109
III.2. Etude de l'échappement immunitaire dans les lymphomes liés à l'EBV.....	176
III.2.1. Synthèse de l'article	176
III.2.2. Article	177
III.3. Etude de thérapies visant l'axe PD-1/PD-L1 sur un modèle de suractivation de NF-κB via LMP1/CD40.....	192
III.3.1. Synthèse de l'article	192
III.3.2. Article	194
IV- Discussion et perspectives.....	202
V- Conclusion générale	208

Table des illustrations

Figure 1 Schéma simplifié de l'hématopoïèse.	1
Figure 2 Schéma simplifié des outils du système immunitaire pour la reconnaissance d'Ag. .	3
Figure 3 Schéma de la structure d'une IgG.	5
Figure 4 Schéma de la réponse à médiation cellulaire et humorale, illustrant le rôle pivot des T CD4.....	10
Figure 5 Schéma du développement B chez l'humain.	12
Figure 6 Représentation du réarrangement $D \rightarrow J_H$	14
Figure 7 Représentation des séquences RSS.	15
Figure 8 Représentation du réarrangement $V_H \rightarrow DJ_H$	16
Figure 9 Schéma du Pré-BCR et du BCR.....	17
Figure 10 Représentation des réarrangements $V_\lambda \rightarrow J_\lambda$ et $V_\kappa \rightarrow J_\kappa$	18
Figure 11 Schéma des CDR1, 2 et 3.	19
Figure 12 Schéma d'un ganglion lymphatique.	22
Figure 13 Schéma d'un follicule primaire et de la réponse extra-folliculaire T dépendante et indépendante.	24
Figure 14 Schéma d'un follicule secondaire et de la réponse T dépendante du CG	26
Figure 15 Schéma de l'action des cellules B régulatrices.	29
Figure 16 Schéma des mécanismes de l'immunosuppression des Treg et de l'induction par les Breg.....	31
Figure 17 Représentation de la contrepartie non tumorale des cellules des LNH choisis en exemple.	33
Figure 18 Représentation de la translocation $t(14;18)$	34
Figure 19 Représentation de la translocations $t(8;14)$	35
Figure 20 Représentation du gène BCL6, de la translocation $t(3;Autre)$ et des mutations somatiques pouvant avoir lieu lors de DLBCL.	37
Figure 21 Schéma du modèle actuel d'infection primaire et persistante de l'EBV proposé par Tonoyan et al.,	42
Figure 22 Schéma des principaux mécanismes d'échappement immunitaire des cellules tumorales.	44
Figure 23 Représentation de la structure de la protéine MYD88.....	46
Figure 24 Schéma des récepteurs TLR/IL-1R et protéines à domaines TIR.	47
Figure 25 Schéma de la signalisation cellulaire dépendante de MYD88 des récepteurs TLRs/IL-1R.....	48

<i>Figure 26 Représentation de la séquence d'acides aminée de la protéine MYD88 et des mutations récurrentes lors des DLBCL-ABC/GCB, BL, MALT.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 27 Diagramme de fréquence de la mutation MYD88^{L265P} dans les différents lymphomes B.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 28 Représentation des conséquences fonctionnelles directes et indirectes de la mutation MYD88^{L265P} dans le cadre de la lymphomagénèse B.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 29 Représentation des sous-unités du complexe NF-κB</i>	<i>54</i>
<i>Figure 30 Représentation des inhibiteurs d'NF-κB.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 31 Représentation des IκB kinases des voies NF-κB</i>	<i>56</i>
<i>Figure 32 Schéma des différents récepteurs et plateforme IKKα, IKKβ, NEMO, à l'origine de l'activation de la voie canonique ou non-canonique d'NF-κB.</i>	<i>57</i>
<i>Figure 33 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec le BCR et le TCR.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 34 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec les récepteurs TLR/IL-1R.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 35 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec le récepteur TFNR.</i>	<i>63</i>
<i>Figure 36 Schéma de la voie de signalisation des RCPG.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 37 Schéma de la voie de signalisation canonique ou non canonique de NF-κB en lien avec la protéine LMP1 de l'EBV.</i>	<i>66</i>
<i>Figure 38 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec le récepteur CD30.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 39 Schéma de la voie de signalisation canonique et non canonique de NF-κB en lien avec les récepteurs RANK, CD40, BCMA, TACI et Fn14.</i>	<i>68</i>
<i>Figure 40 Schéma de la voie de signalisation canonique et non canonique de NF-κB en lien avec les récepteurs LTβR et BAFFR.</i>	<i>70</i>
<i>Figure 41 Schéma de l'impact de l'inactivation des gènes en rapport avec l'activation de NF-κB dans des modèles murins.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 42 Modèle de l'émergence clonale du lymphome B indolent.</i>	<i>193</i>

Table des tableaux

<i>Tableau 1 Les différents isotypes d'immunoglobuline chez l'humain et leur caractéristique. .</i>	<i>6</i>
<i>Tableau 2 Marqueurs des différentes cellules B de transition chez l'humain et la souris</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 3 Modèles murins permettant l'étude des protéines influençant l'activité de NF-κB</i>	
<i>NON ABERRANTES</i> dans les lymphomes B.	<i>81</i>
<i>Tableau 4 Liste des gènes aberrants et fréquence (%) d'apparition dans les lymphomes B</i>	
<i>agressifs et indolents.....</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 5 Modèles murins permettant l'étude des protéines influençant l'activité de NF-κB</i>	
<i>ABERRANTES</i> dans les lymphomes B.	<i>99</i>

Avant-propos

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), 56,9 millions de personnes sont décédées dans le monde en 2016. Les cancers sont la seconde plus grande cause de mortalité dans le monde. Le nombre de décès par cancer a été estimé à 9,6 millions (16%) derrière les maladies cardiovasculaires (15,2 millions) et devant les bronchopneumopathies obstructives chroniques (3 millions).

En 2018, le lymphome Hodgkinien (LH) et non Hodgkinien (LNH), dont le LNH lié aux cellules B (LNHB), la leucémie lymphoïde chronique B (LLC) et autres LNH des cellules T ou NK, ont causé 583 897 décès dans le monde. C'est donc plus d'un demi-million de personnes qui décède chaque année d'une néoplasie maligne d'un type particulier de globule blanc, les lymphocytes. En France, les lymphomes (LH et LNH) représentent la 5^{ème} cause de cancer (257 692 cas) derrière le cancer de la prostate (514 716 cas) et devant celui de la vessie (213 387 cas). De plus, ils sont la 5^{ème} cause de mortalité due à un cancer (127 020 décès) derrière le cancer du pancréas (141 332 décès) et devant le cancer de la prostate (116 317 décès).

La découverte de nouvelles thérapies plus efficaces et plus ciblées permettant de minimiser les effets secondaires, les rechutes et les résistances aux traitements, passe nécessairement par la compréhension de la maladie. L'étude de l'émergence d'un cancer permet donc de découvrir les facteurs génétiques causant la transformation d'une cellule normale en cellule maligne. Ces connaissances nous amènent à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques qui sont testées *in vitro* et *in vivo* dans des conditions physiologiques tumorales de plus en plus similaires aux pathologies humaines. Le développement de modèles *in vitro* et *in vivo* est presque toujours une étape indispensable.

Mon travail de thèse a porté sur la modélisation de la macroglobulinémie de Waldenström, un cancer incurable particulier du lymphocyte B associé à MYD88^{L265P}. Mon introduction bibliographique porte sur le fonctionnement des cellules du sang et de la réponse immune. La genèse des cellules B est détaillée ainsi que la lymphomagénèse. Ensuite les protéines MYD88 et NF-κB sont décrites ainsi que leur voie de signalisation et leur rôle majeur dans l'émergence et le développement des lymphomes. La dernière partie de l'introduction porte

sur l'importance des modèles murins dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la lymphomagénèse et dans le développement des traitements.

La partie résultats présente dans un premier temps la caractérisation d'un nouveau modèle murin de suractivation NF- κ B développant un lymphome présentant de nombreux points communs avec la macroglobulinémie de Waldenström mais aussi des différences ; dans un second temps une étude du rôle des protéines de l'échappement immunitaire dans l'émergence d'un lymphome ; et dans un troisième temps, une étude préclinique de thérapies visant des protéines de l'échappement immunitaire dans un modèle murin suractivant la protéine NF- κ B.

I- Introduction

I.1. Le sang

Le corps humain peut contenir 4 à 6 litres de sang, il est composé de plasma (partie liquide) où l'on retrouve du sel, des protéines, des minéraux et des cellules. On retrouve en moyenne dans un millilitre de sang de patient sain, 4 à 5 millions de globules rouges, 4 000 à 10 000 globules blancs et 150 000 à 400 000 plaquettes. Toutes les cellules du sang proviennent d'une même cellule souche présente dans la moelle osseuse : la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ce processus de différenciation permettant la formation des cellules du sang s'appelle l'hématopoïèse (Figure 1).

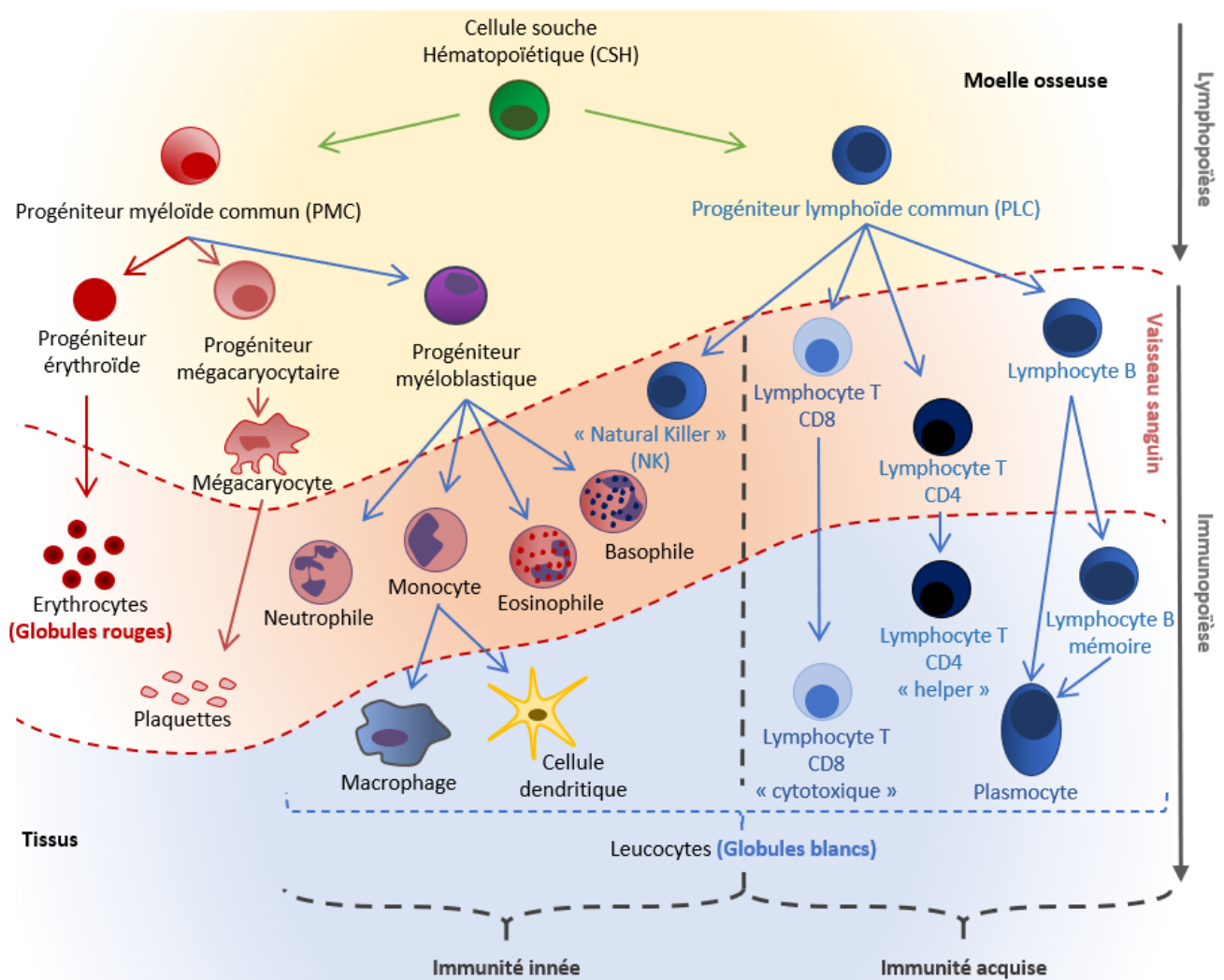


Figure 1 Schéma simplifié de l'hématopoïèse.

La cellule souche hématopoïétique (CSH) de la moelle osseuse peut former un progéniteur myéloïde commun (PMC) qui donnera naissance (i) aux érythrocytes (globules rouges) en passant par le stade érythroblaste, (ii) aux plaquettes en passant par les stades mégacaryoblastes et mégacaryocytes, (iii) à certains leucocytes (globules blancs) : Neutrophiles, Monocytes, Eosinophiles, Basophiles en passant par le stade myéloblaste. La CSH peut également se différencier en progéniteur lymphoïde commun (PLC) qui peut donner naissance aux « Natural killer » (NK), lymphocytes T et B. De plus, d'autres globules blancs peuvent terminer leur différenciation hors de la circulation sanguine : les macrophages et les cellules dendritiques qui sont issus de la différenciation du monocyte ou encore les plasmocytes ou lymphocytes B mémoires issus du lymphocyte B (Figure adaptée de (Passequé et al. 2003)).

Le sang a 3 rôles majeurs en fonction des différentes cellules qu'il contient.

- L'oxygénation des organes grâce à l'hémoglobine des globules rouges (hématies ou érythrocytes) qui permettent le transport de l'oxygène, et l'évacuation du CO₂.
- La coagulation pour permettre la cicatrisation dans le cas d'une lésion grâce aux plaquettes et aux protéines de la coagulation.
- La recirculation des globules blancs (leucocytes) en charge de la réponse immunitaire, c'est-à-dire, la défense contre les corps étrangers nano-microscopiques comme notamment les bactéries, les virus, les champignons, aussi appelés antigènes (Ag).

I.2. La réponse immunitaire innée dite non spécifique

Intervenant après les barrières physiques comme les poils, la peau et les muqueuses, la réponse immune innée constitue la première ligne de défense face à une infection. Dans cette réponse il n'y a pas de « mémoire » immunitaire. Les éléments qui la constituent sont :

- Les cellules agissant de manière non spécifique contre les antigènes (Ag) : Macrophages (stade postérieur au monocyte) qui ont pour rôle de phagocyter l'Ag, ainsi que les cellules NK et les neutrophiles qui sécrètent des protéines capables de lyser la cellule étrangère (Figure 1).
- Le complément : groupe de protéines présentes dans le sang formant des complexes à la membrane des cellules étrangères permettant de lyser des cellules (formation de pores à la membrane) mais aussi de recruter les macrophages ou les lymphocytes et d'initier la réponse immunitaire adaptative.

I.3. La réponse immunitaire adaptative dite spécifique

I.3.1. La reconnaissance du corps étranger

La réponse immunitaire adaptative est dite spécifique car elle correspond à la mise en jeu de cellules de l'immunité de manière ciblée grâce à un système de reconnaissance spécifique, le récepteur à l'antigène. Comparé à la réponse immunitaire innée, il existe pour la réponse adaptative un mécanisme permettant de « sauvegarder » certaines des cellules ayant déjà réagi une première fois à un Ag (réponse primaire). Ce mécanisme plus couramment appelé « mémoire immunitaire », implique le récepteur à l'antigène et permet à l'organisme, lors d'un deuxième contact avec le même Ag, de réagir plus vite et plus efficacement (réponse secondaire). Ces deux types de réponse (primaire et secondaire) sont décrits par la suite.

La reconnaissance d'un Ag peut se réaliser de plusieurs manières. Il peut être reconnu sous forme native par les immunoglobulines (Ig) membranaires, retrouvées soit à la surface des lymphocytes B (constituant le récepteur des lymphocytes B, le BCR) (Figure 2A), soit sécrété (anticorps ; Ac) par des plasmocytes et présentes librement dans le sang (Figure 2B). Les Ac peuvent avoir une action de neutralisation de l'Ag. Ils permettent aussi aux cellules dendritiques et macrophages de phagocyter l'Ag sous forme de complexes immuns (grâce à leur récepteur de la région Fc des Ac décrit par la suite) ; ils peuvent être activateurs du complément.

L'Ag peut aussi être reconnu sous forme de peptide grâce à une cellule présentatrice de l'Ag (CPA) et à son complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par les récepteurs des lymphocytes T (TCR) (Figure 2C).

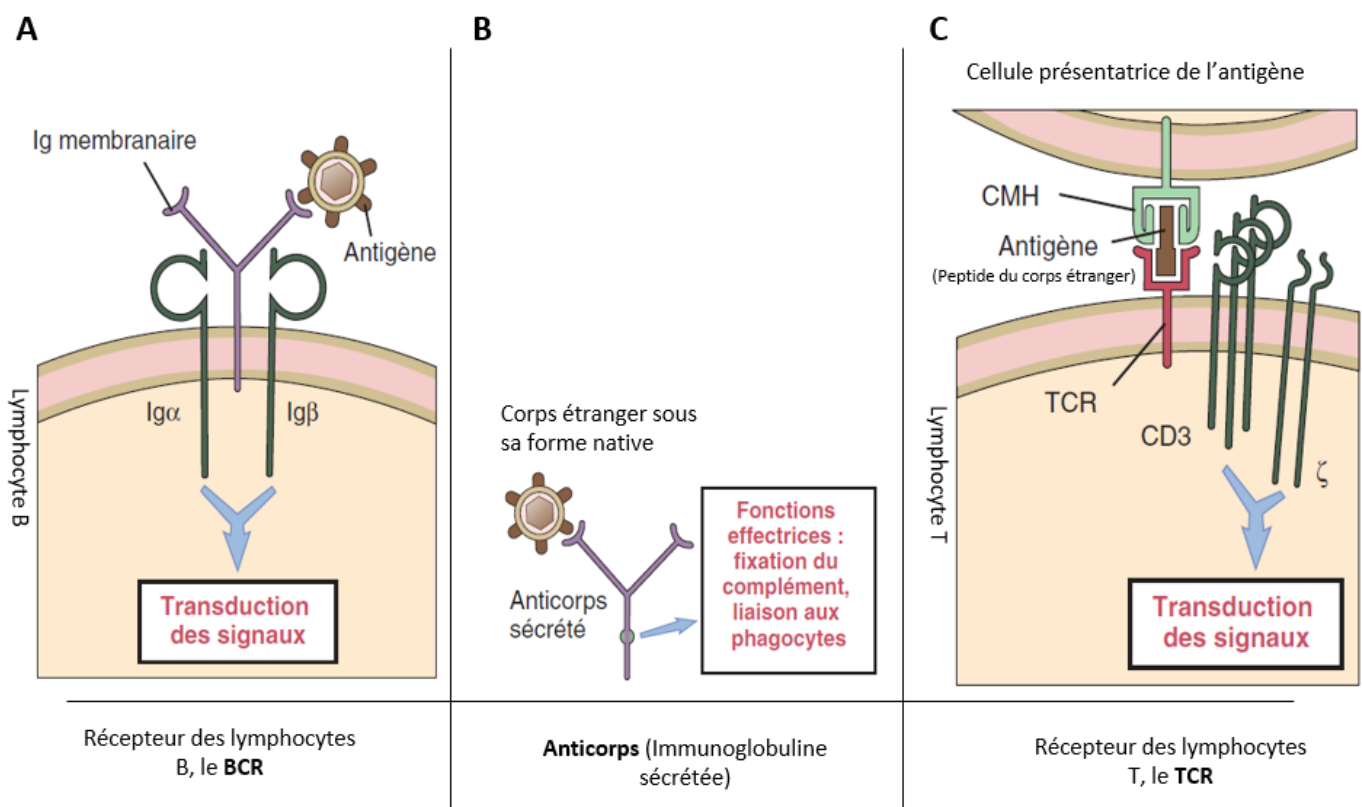


Figure 2 Schéma simplifié des outils du système immunitaire pour la reconnaissance d'Ag. A : Le BCR, B : L'Ac, C : Le TCR (Figure adaptée de (K. Abbas et H. Lichtman 2009)).

I.3.1.1. Le BCR

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines qui peuvent être membranaires (le BCR, ancrées dans la membrane des lymphocytes B) ou sécrétées (l'Ac) par les plasmocytes. Le BCR est spécifique à chaque lymphocyte B grâce au réarrangement des gènes des immunoglobulines. Ce dernier point sera détaillé dans le chapitre sur la maturation des lymphocytes B (section I.3.3). Le BCR a la capacité de reconnaître l'Ag sous sa forme native. Cependant n'ayant pas une partie intracellulaire permettant de transmettre le signal, ce sont les protéines membranaires CD79A (Ig α) et CD79B (Ig β) qui assurent la fonction de transduction des signaux intracellulaires (Figure 2A).

I.3.1.2. Structure des Ig

Les Ig sont composées de deux chaînes lourdes H pour « Heavy » identiques, et de deux chaînes légères L pour « Light » identiques deux à deux qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Elles possèdent une région variable V (qui reconnaît spécifiquement un Ag) et une région constante C (qui possède les propriétés effectrices de la réponse à cet Ag). La partie variable du fragment de liaison à l'Ag (région Fab) contient des sites spécifiques de reconnaissance de l'Ag appelés paratopes. La partie de l'Ag reconnue par l'Ac est l'épitope ou déterminant antigénique. L'Ig possède aussi une autre partie appelée fragment cristallisable (région Fc) contenant un site de liaison au complément. Le Fab et le Fc sont reliés par le site charnière (Figure 3).

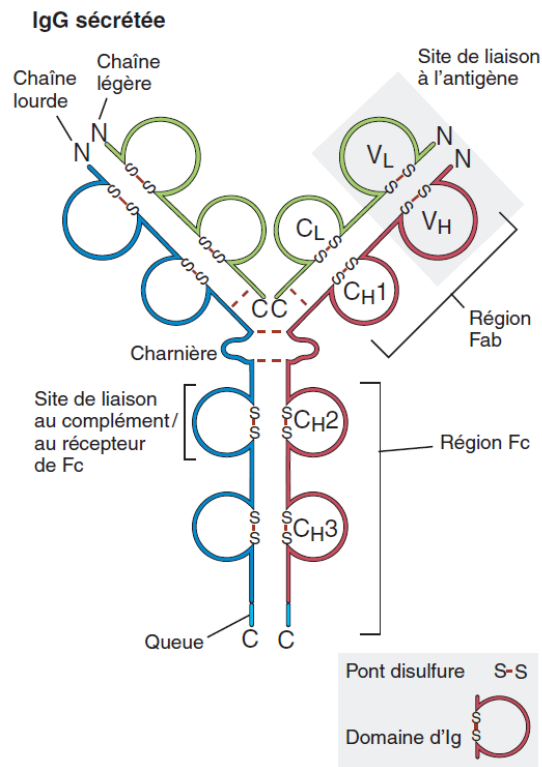
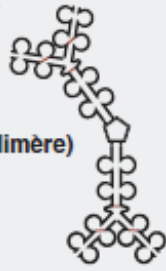

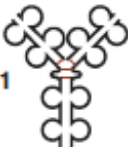
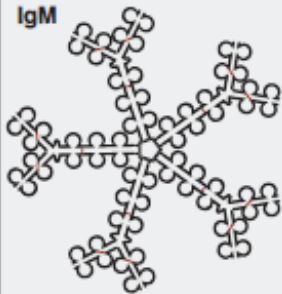


Figure 3 Schéma de la structure d'une IgG.
(Figure adaptée de (K. Abbas et H. Lichtman 2009))

Les Ig sont divisées en plusieurs isotypes (catégories) : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM (Tableau 1). Ces isotypes sont caractérisés par le type de leur chaîne lourde (respectivement : α , δ , ϵ , γ , μ). La chaîne légère L peut être de type λ ou κ , et peut s'associer à toutes les différentes chaînes lourdes. Les différentes chaînes L sont très similaires mais elles diffèrent au niveau de la région constante C_L . Toutes les Ig membranaires sont monomériques alors que les Ig sécrétées peuvent être dimériques (IgA) ou pentamériques (IgM). L'IgD, non sécrétée, est uniquement exprimée à la membrane des lymphocytes B dits matures (ayant achevé ses réarrangements des chaînes d'Ig et exprimant un BCR fonctionnel).

Tableau 1 Les différents isotypes d'immunoglobuline chez l'humain et leurs caractéristiques.
(Adapté de (K. Abbas et H. Lichtman 2009))

Isotype de l'anticorps	Sous-type	Chaîne H	Concentration sérique (mg/ml)	Demi-vie sérique (jours)	Forme sécrétée	Fonctions
IgA	IgA 1, 2	α (1 ou 2)	3,5	6	Monomère, dimère, trimère  IgA (dimère)	Immunité des muqueuses
IgD	Aucun	δ	Trace	3	Aucune	Récepteur d'antigènes des lymphocytes B naïfs
IgE	Aucun	ϵ	0,05	2	Monomère  IgE	Activation des mastocytes (hypersensibilité immédiate) Défense contre les parasites helminthiques
IgG	IgG 1-4	γ (1, 2, 3 ou 4)	13,5	23	Monomère  IgG1	Opsonisation, activation du complément, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps, immunité néonatale, inhibition rétroactive des lymphocytes B
IgM	Aucun	μ	1,5	5	Pentamère  IgM	Récepteur d'antigènes des lymphocytes B naïfs, activation du complément

L'Ig de type M est l'Ig sécrétée lors d'une première rencontre avec un Ag : c'est l'isotype de la réponse immunitaire primaire. Elle a un rôle important du fait de sa forme pentamérique et donc de sa grande valence (valence = 5 glycoprotéines reliées entre elles x 2 paratopes = 10 sites de liaison à l'Ag). Ainsi, les chances de liaison avec l'Ag sont augmentées, même si l'affinité est souvent faible.

Chez l'humain, l'IgG a 4 sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), elle est sécrétée en grande quantité lors de la réponse immune adaptative secondaire (2^{ème} rencontre avec le même Ag).

L'IgA est la principale Ig des sécrétions externes. Elle est retrouvée en grande quantité dans les muqueuses. Il existe 2 sous classes, l'IgA1 bien plus présente (90%) que l'IgA2 (10 %). Cette Ig est sécrétée par des plasmocytes à IgA présents sous les surfaces épithéliales externes.

L'IgE est impliquée dans la reconnaissance des allergènes et des parasites. Elle est aussi impliquée dans les allergies via le récepteur Fc-IgE des basophiles et mastocytes entraînant une réponse immunitaire disproportionnée libérant des médiateurs (histamines...).

I.3.1.3. Le TCR et le CMH

Au même titre que le BCR, le TCR ne peut pas transmettre seul le signal dans la cellule. Il est nécessaire qu'il soit agrégé avec les protéines du CD3. Il existe 2 types de TCR : le TCR $\alpha\beta$, présent sur plus de 95% des lymphocytes périphériques (les lymphocytes T CD4 ou CD8) et sur la majorité des thymocytes exprimant un TCR ; et le TCR $\gamma\delta$, présent à la surface des cellules T retrouvées notamment dans les épithéliums. La présentation de l'Ag par les cellules présentatrices de l'Ag (CPA) est nécessaire pour l'activation des cellules T $\alpha\beta$, contrairement aux cellules T $\gamma\delta$. Les CPA peuvent être un monocyte, un macrophage, une cellule dendritique ou un lymphocyte B. Elles ont toutes la capacité d'internaliser l'Ag et de le dégrader en une multitude de peptides qui sont alors liés à une protéine membranaire hautement polymorphe (propre à chaque individu) le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Une fois à la membrane ce complexe CMH-peptide peut être reconnu par le TCR $\alpha\beta$ et entraîné une réponse spécifique de la part de la cellule T. Il existe 2 complexes majeurs d'histocompatibilité : Le CMHI, exprimé par toutes les cellules de l'organisme et reconnu par le TCR $\alpha\beta$ des cellules T CD8 ; Le CMHII présent uniquement à la surface des CPA et reconnu par le TCR $\alpha\beta$ des cellules T CD4.

I.3.2. Quelques rappels sur la réponse à médiation cellulaire

Ce type de réponse est basé sur la coopération entre les CPA et les LT. Lorsqu'une CPA phagocyte un corps étranger, ce dernier se retrouve dans un phagosome au niveau du cytoplasme. Ce phagosome fusionne ensuite avec un lysosome pour former le phagolysosome permettant la dégradation de l'Ag par des enzymes (lysozymes).

Les peptides présentés via le CMHI sont issus de la dégradation d'un Ag par le protéasome. Les protéines TAP1 et TAP2 assurent le passage des peptides du cytoplasme au réticulum et permet l'association au CMHI avant son transport à la membrane. Ce complexe est ensuite reconnu par le TCR $\alpha\beta$ des lymphocytes T CD8 cytotoxiques.

Les T CD8 cytotoxiques nouvellement formés migrent alors dans les tissus et interagissent avec le CMHI des cellules cibles, entraînant la lyse des cellules tumorales ou infectées en formant des pores dans leur membrane grâce à la sécrétion de perforines, et induisant leur mort grâce à une autre enzyme (granzyme) qui passe par les pores créés dans la membrane de la cellule cible.

Une fois l'Ag fragmenté dans le phagolysosome, le CMHII peut s'associer à un peptide antigénique et être transporté à la membrane de la cellule. Le CMHII de la CPA peut ensuite être reconnu par le TCR $\alpha\beta$ du lymphocyte T CD4 auxiliaires. De plus les cellules B et T CD4 coopèrent lorsque le BCR est internalisé avec son Ag, fragmenté puis présenté sous forme de peptide antigénique lié au CMHII.

Les LT CD4 auxiliaires ou helpers ont un rôle de pivot dans la réponse immunitaire. Les CD4 sont indispensables et orientent vers une réponse immune B adaptative ou vers une réponse immune T CD8 cytotoxique (réponse TH1 et TH2, notamment via les cytokines IL2 et IFN γ d'une part et IL4 et IL5 d'autre part). Leur activation entraîne la sécrétion de protéines appelées cytokines. Ces cytokines se retrouvant dans le milieu extracellulaire sont captées par des récepteurs spécifiques présents sur les lymphocytes T CD8. L'activation de ces récepteurs entraîne une co-signalisation cellulaire permettant d'activer les voies de prolifération de la cellule.

Après avoir été activés, les lymphocytes T CD8 et CD4 peuvent aussi devenir des lymphocytes mémoires qui pourront être réactivés en cas de nouveau contact avec ce même corps étranger (Figure 4).

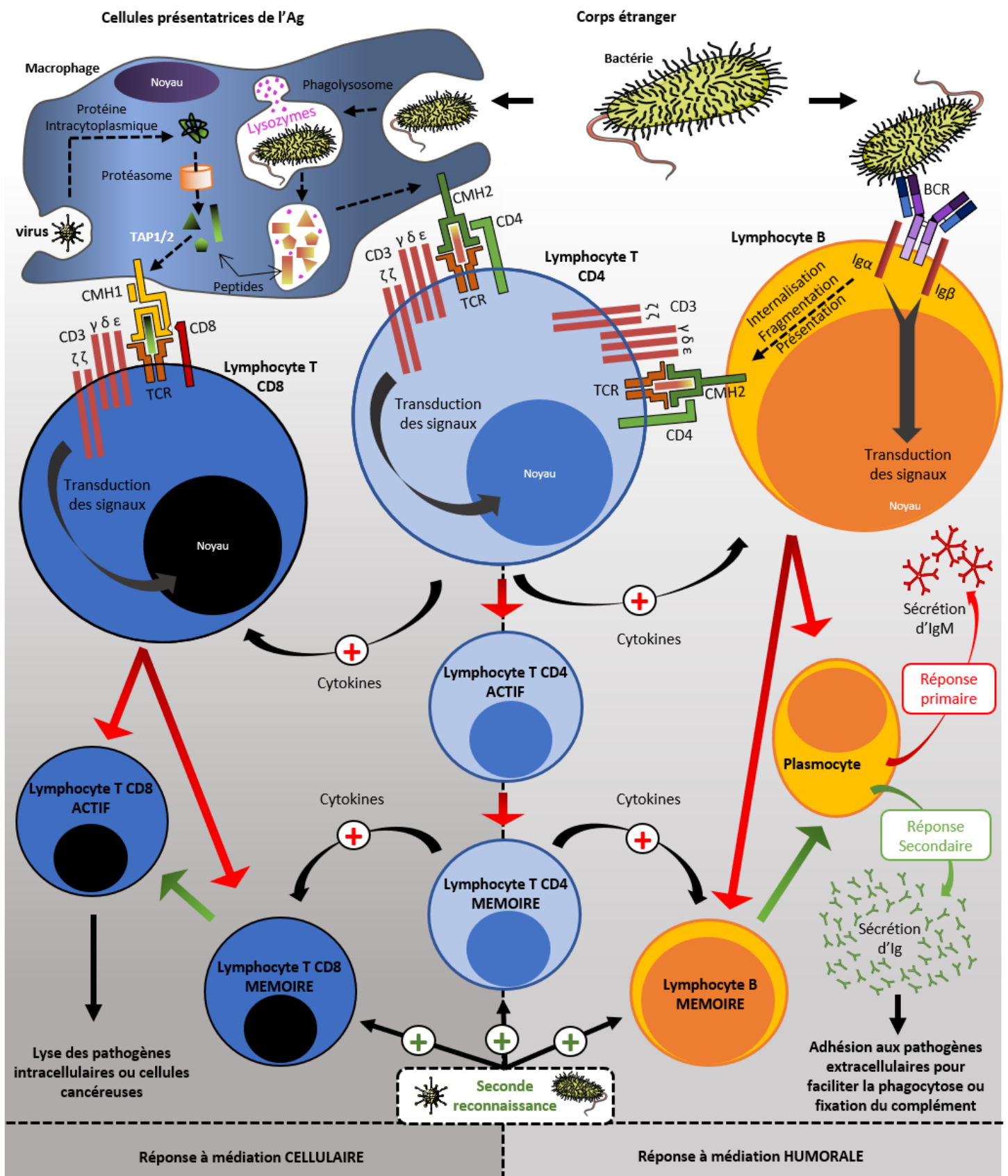


Figure 4 Schéma de la réponse à médiation cellulaire et humorale, illustrant le rôle pivot des T CD4. La différenciation cellulaire lors du premier contact avec l'Ag est indiquée par des flèches rouges, et lors de la deuxième rencontre, par des flèches vertes. Les flèches avec un « + » rouge indiquent une stimulation, les flèches avec un « + » vert symbolisent la réactivation (Schéma original).

I.3.3. La réponse à médiation humorale : La cellule B

L'activation de la cellule B via la liaison du BCR à l'Ag permet la prolifération et la différenciation en lymphocytes B mémoires, ainsi qu'en plasmocytes. Les plasmocytes de la réponse immune primaire produisent des IgM. Ceux de la réponse immune secondaire peuvent produire des IgG/A/E, et cela en bien plus grande quantité lors de la réponse secondaire. La réponse humorale pour la plupart des Ag, dépend à la fois des cellules T et des cellules B qui, ensemble, reconnaissent de manière coordonnée le même Ag. Ce type de réponse est dite T-dépendante et fait intervenir un sous-type de lymphocytes T, les CD4 helper ou auxiliaires, qui participent à l'expansion clonale des lymphocytes B via la sécrétion de cytokines (IL-2 et IL-4 notamment). Cependant, il existe également des Ag qui activent les lymphocytes B sans coopération des lymphocytes T, notamment les motifs sucrés. On parle alors de réponse T-indépendante (Figure 4) (Libby 2007).

Le développement des cellules B a lieu dans le foie au stade embryonnaire. Puis, tout au long de notre vie la différenciation des lymphocytes B débute dans la moelle osseuse (organe lymphoïde primaire) et se termine dans les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques. Les cellules B, issues des CSH, sont produites tout au long de notre vie (Figure 5A) (Melchers 2015).

Au cours de leur développement, les cellules B réagissent différemment aux signaux des micro-environnements de la moelle osseuse, du sang et des tissus (expression de protéines membranaires, de facteurs de transcription, de cytokines, recombinaisons géniques) (Figure 5B-E). Ces différents signaux sécrétés par les cellules stromales, épithéliales et hématopoïétiques sont apparentés à différents type de cytokines. De façon succincte et sans entrer dans les détails de chacune d'elles, les cytokines peuvent être divisées en 5 familles (Akdis et al. 2016; Catalan-Dibene, McIntyre, et Zlotnik 2018; Sokol et Luster 2015) :

- Les interleukines (IL1 à 40)
- Les chimiokines (CXCL1 à 17, CCL1 à 28, XCL1 et 2, CX3CL1)
- Les interférons (IFN)
- Les "tumor necrosis factor" (TNF)
- Les "colony stimulating factors" (CSF)

La combinaison spatiale et temporelle de ces messagers extracellulaires contribue à faire de la réponse immune B un phénomène complexe hautement régulé.

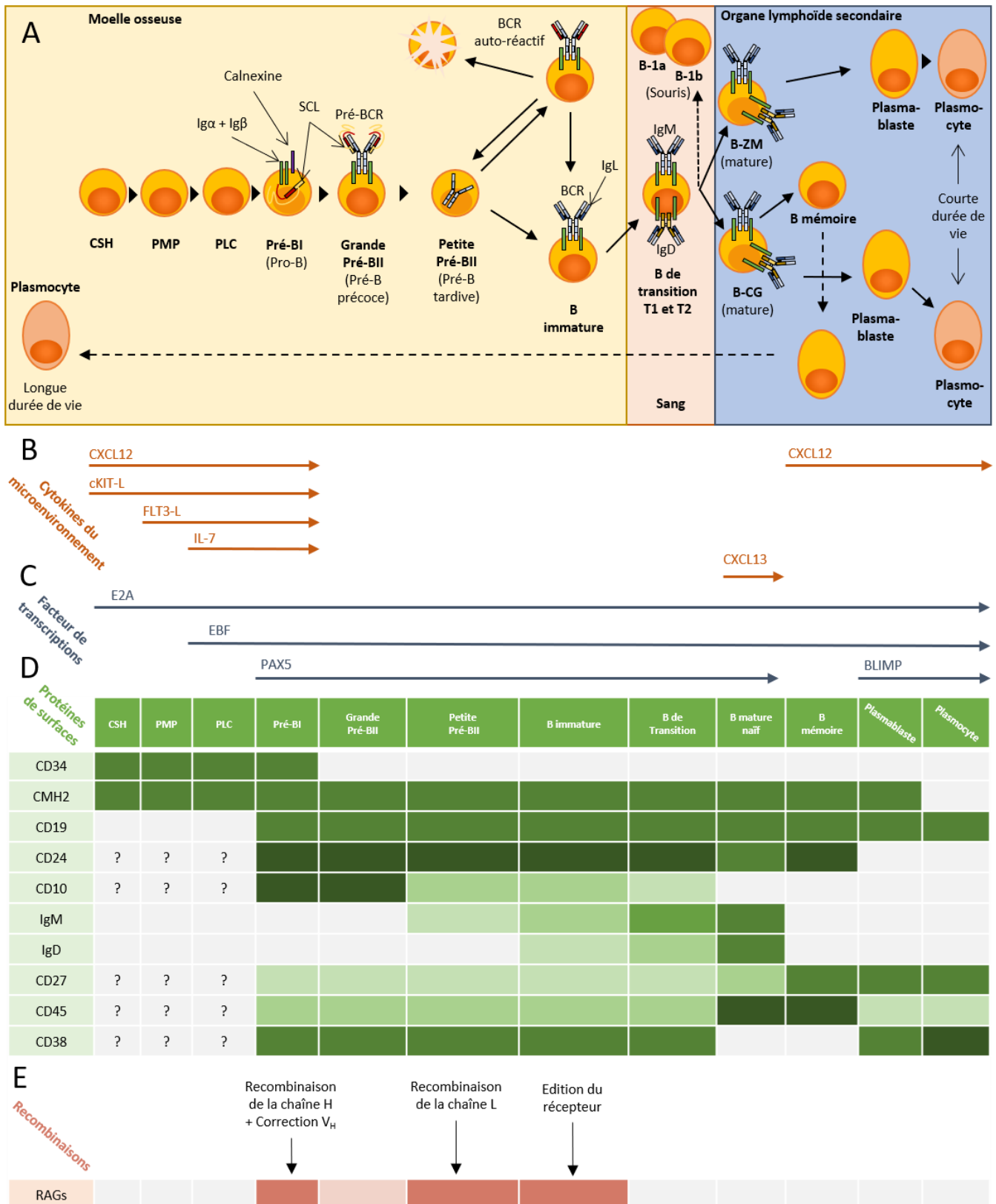


Figure 5 Schéma du développement B chez l'humain.

A : Les stades de la différenciation B : Cytokines du microenvironnement permettant la chimio-attraction. C : Facteurs de transcription permettant la différenciation. D : Expression des protéines de surface en fonction des différents stades (intensité de couleur en fonction de l'expression) E : Expression des enzymes RAG1 et RAG2 permettant les recombinaisons. (Figure adaptée de (Meffre, Casellas, et Nussenzweig 2000; Almqvist et Mårtensson 2012; Melchers 2015; Nemazee 2017; Carrion et al. 2019))

I.3.3.1. Différenciation des cellules B dans la moelle osseuse

I.3.3.1.1. CSH, PMP et PLC

Les CSH sont des cellules souches pluripotentes et ont pour descendance des progéniteurs multipotents (PMP). La présence des récepteurs cKIT et CXCR4 à la membrane des CSH (cKIT+, CXCR4+) participe à la rétention et à l'auto-renouvellement des CSH dans la moelle osseuse. Les cellules stromales (fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes), sécrètent la chimiokine CXCL12 qui est le ligand de CXCR4. Ce dernier une fois activé joue un rôle dans la rétention des CSH dans la moelle osseuse. Les cellules endothéliales qui expriment le ligand cKIT-LG entraînent l'expansion des CSH (Figure 5) (Wilson et Trumpp 2006; Mahony et Bertrand 2019).

Comme les CSH, les PMP expriment CXCR4 et cKIT. Ces cellules expriment aussi le récepteur FLT3 (cKIT+, CXCR4+, FLT3+). FLT3 est exprimé jusqu'au stade Pro-B et participe à la formation des progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) avec les facteurs de transcription E2A et « Early B-cell Factor 1 » (EBF) (Figure 5) (Sitnicka et al. 2003).

La proximité physique des PMP (qui expriment le récepteur IL7-R α) avec les cellules réticulaires fibroblastiques qui produisent de l'IL7 est essentielle à leur différenciation en PLC. Ces dernières expriment alors le facteur de transcription EBF et la lymphopoïèse débute (Figure 5) (Tokoyoda et al. 2004; Melchers 2015).

Une partie de ces PLC migre jusqu'au thymus dans lequel est formé les lymphocytes T (la lymphopoïèse T n'est pas traitée dans ce manuscrit). L'autre partie reste dans la moelle osseuse pour former les lymphocytes pro-B qui vont se différencier successivement en pré-B puis en B immatures (V. W. C. Yu et Scadden 2016).

I.3.3.1.2. Stade Pré-BI (Pré-Pro-B + Pro-B)

La cellule Pré-Pro-B est la cellule précoce du stade Pré-BI (Pro-B). La cellule Pré-BI exprime le facteur de transcription « *paired box gene 5* » (PAX5) qui engage la différenciation en cellules B. Les premiers précurseurs de B engagés expriment aussi les facteurs de

transcription EBF et E2A qui sont nécessaires à la régulation des enzymes de recombinaison « recombination-activating genes » RAG-1 et RAG-2 (Tobón, Izquierdo, et Cañas 2013).

A ce stade commence la mise en jeu des mécanismes de diversification des immunoglobulines au sein du locus IgH. Dans ce locus se situent les segments IgV_H qui codent la partie variable (V) de la chaîne lourde (H) de l'Ig ; les segments IgD qui codent la partie diversité (D) que l'on ne trouve que dans le locus IgH (absent des loci IgL) ; les segments IgJ_H qui codent la partie jonction (J) de la chaîne lourde ; les segments IgC_H (μ/δ/γ/ε/α) qui codent pour la partie constante respectivement de l'IgM, IgD, IgG, IgE et IgA (Figure 6) (Early et al. 1980; Tonegawa 1983).

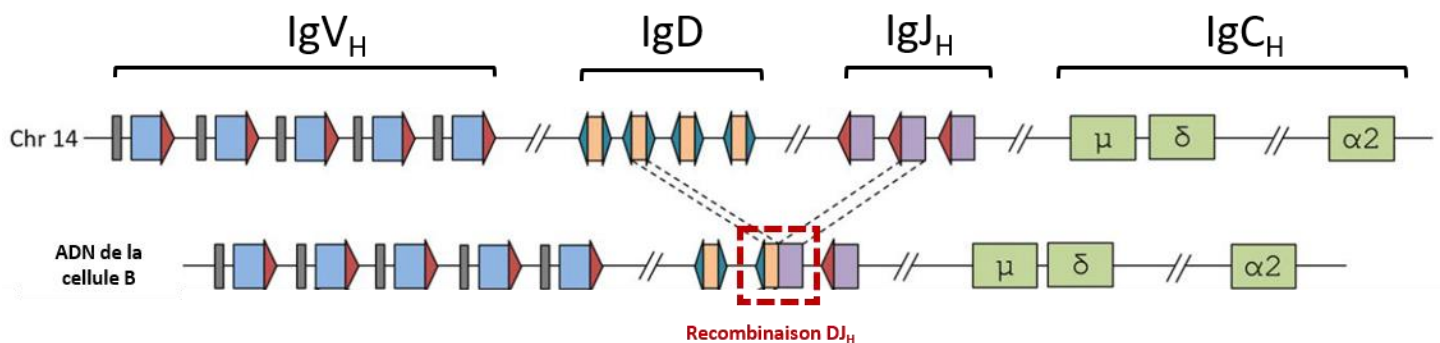


Figure 6 Représentation du réarrangement $D \rightarrow J_H$. Représentation des régions V_H, D, J_H, C_H (rectangles), des RSS 12 ou 23 nucléotides (triangles) et du locus de la chaîne IgH (chromosome 14) (Figure adaptée de (Dunn-Walters et al. 2018)).

Les segments V, D et J sont flanqués par des séquences signales de recombinaison ou « recombination signal sequences » (RSS). Les séquences RSS sont composées d'une séquence spécifique de 7 nucléotides (heptamère), d'un « spacer » de 12 ou 23 nucléotides et d'une autre séquence spécifique de 9 nucléotides (nonamère) (Figure 7) (Ru, Zhang, et Wu 2018).

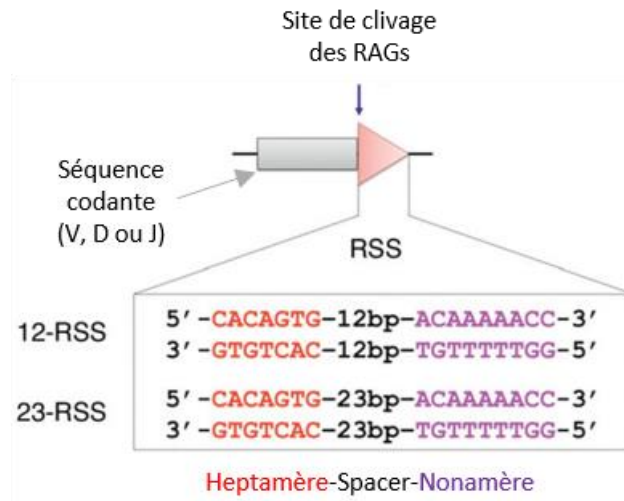


Figure 7 Représentation des séquences RSS.
Séquences 12-RSS et 23-RSS flanquées aux segments V, D et J. (Figure adaptée de (Ru, Zhang, et Wu 2018))

Les RAGs reconnaissent les RSS et génèrent des cassures double brin de l'ADN au niveau du locus IgH. Un premier clivage de l'ADN au niveau des RSS s'effectue au niveau d'un des segments D et un autre au niveau d'un segment J_H (Schatz, Oettinger, et Baltimore 1989; Ru, Zhang, et Wu 2018). De plus, lors de cette recombinaison de l'ADN, l'enzyme « Terminal deoxynucleotidyl Transférase » (TdT) (qui n'est produite que dans les lymphocytes) va rajouter aléatoirement des nucléotides (Schroeder et Cavacini 2010). Ainsi, la formation d'une boucle au niveau du site de recombinaison contribue la réalisation d'un jointement circulaire entraînant l'élimination de la boucle d'excision, et un jointement linéaire non homologues rapprochant les segments D et J_H. Les protéines du processus de réparation des jonctions non homologues de l'ADN (qui sont continuellement exprimées) sont alors recrutées. Ce phénomène est appelé « Non Homologous End-Joining » (NHEJ) (Figure 6) (Dunn-Walters et al. 2018).

Une deuxième recombinaison a lieu ensuite et requiert l'accessibilité aux segments V_H (rendus accessibles grâce à la première recombinaison) mais aussi la présence de PAX5 (Nutt et al. 1997) et d'IL7 (Corcoran et al. 1998). A lieu alors, le rapprochement d'un segment V_H avec le segment D_HJ_H réarrangé selon la même mécanique. Ceci permet alors, après transcription de l'ADN, d'obtenir un ARN pré-messager (non mature). Ce dernier est ensuite modifié par épissage pour donner l'ARN messager (mature) (Figure 8) (Dunn-Walters et al. 2018).

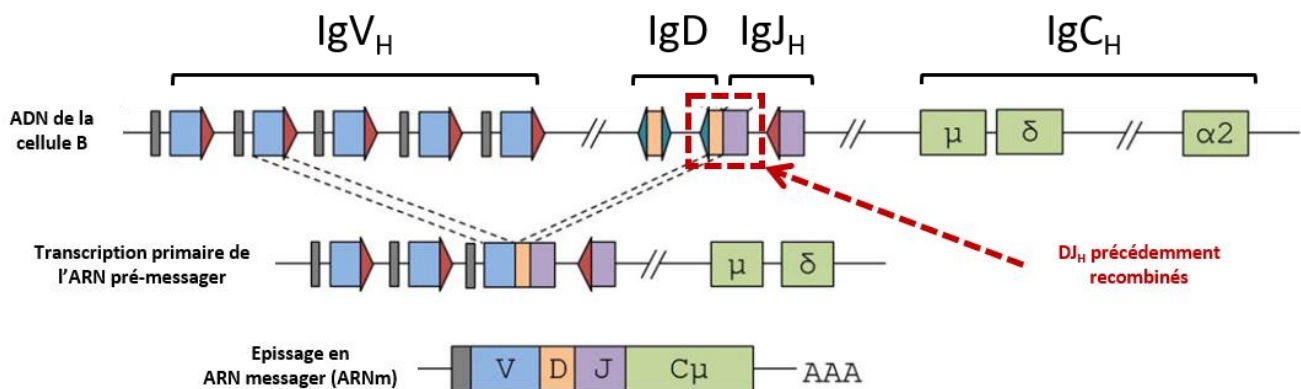


Figure 8 Représentation du réarrangement $V_H \rightarrow D_J_H$
 Représentation des régions V_H , D , J_H et C_H après le réarrangement D_J_H et de la transcription en ARN pré-messager et épissage en ARN messenger (ARNm) (Figure adapté de (Dunn-Walters et al. 2018)).

A ce stade, la cellule Pré-BI produit aussi un substitut de chaîne légère constitué des protéines VpreB et $\lambda 5$ (Y.-H. Wang et al. 1998). Il a aussi été démontré que les protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ permettant la transduction du signal du BCR sont déjà produites et amenées à la surface de la cellule Pré-BI grâce à la protéine chaperonne, la calnexine (Nagata et al. 1997).

Chaîne lourde V_H non fonctionnelle

Après la recombinaison des domaines $V_H D_J_H$ qui a eu lieu au stade Pro B, l'ajout d'un nombre aléatoire de nucléotides par l'enzyme TdT dans la partie codante de l'ADN peut causer le décalage du cadre de lecture ou « reading frame » (RF). Il existe 3 cadres de lecture possibles correspondant aux 3 nucléotides d'un codon : RF1, RF2, RF3. Si l'ajout de nucléotides décale le cadre de lecture en 2^{ème} position (RF2), cela peut faire apparaître un codon STOP dans le gène entraînant la production d'une protéine tronquée et donc défectueuse. Ainsi, la formation d'une chaîne tronquée D_μ empêche la recombinaison V_H vers D_J_H , l'autre chromosome peut alors être utilisé (Meffre, Casellas, et Nussenzweig 2000; Reth, Jackson, et Alt 1986).

I.3.3.1.3. Stade Grande Pré-BII (Pré-B précoce)

La partie constante « C » de l'IgM (C_μ) et les régions recombinaisonnées $V_H D_J_H$ donnent naissance à la chaîne lourde IgM (H_μ) qui peut s'associer avec le substitut de chaîne légère (SCL). L'assemblage des chaînes lourdes H_μ avec les SCL et les corécepteur CD79A ($Ig\alpha$), CD79B ($Ig\beta$) forme le pré-BCR à la surface de la cellule. Ceci marque le passage au stade grande Pré-BII (Winkler et Mårtensson 2018).

Le pré-BCR correctement formé à la membrane délivre un signal de survie à la cellule Pré-B. La protéine $\lambda 5$ du SCL possède une queue non liée à l'immunoglobuline composée d'acides aminés chargés positivement (7 arginines + 1 lysine) (Figure 9). Cette dernière permet la liaison à des molécules encore peu connues à ce jour. Le pré-BCR est essentiel à la survie de la cellule Pré-BII, en son absence la cellule meurt par apoptose (Übelhart et Jumaa 2015; Melchers 2015).

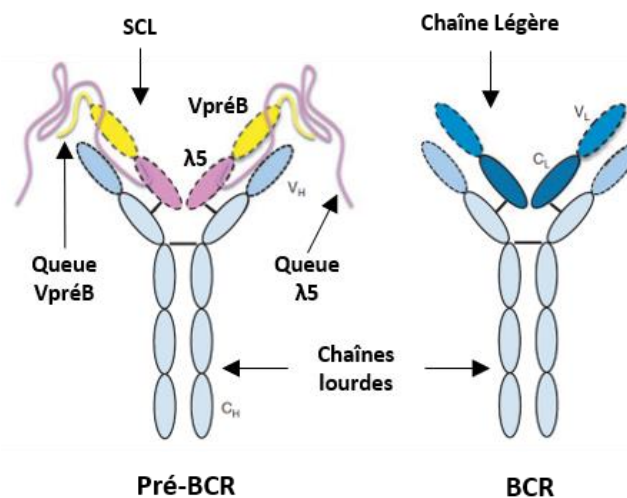


Figure 9 Schéma du Pré-BCR et du BCR.
(figure adapté de (Winkler et Mårtensson 2018))

Expression d'une seule chaîne lourde IgH = Exclusion allélique

L'exclusion allélique est un mécanisme permettant d'inhiber les réarrangements des loci des Ig par les RAGs, permettant l'expression des gènes d'un seul allèle. Ces réarrangements sont stoppés lorsque le pré-BCR est activé. Lors de cette activation, une diminution de l'expression des gènes *RAG1*, *RAG2* et *TDT* ne permettant pas le réarrangement du 2^{ème} allèle. C'est la raison pour laquelle chaque cellule pré-B n'exprime qu'un type de chaîne lourde H μ et donne donc une cellule grande Pré-BII unique avec 2 chaînes lourdes IgH μ identiques (Galler et al. 2004; Parker et al. 2005; Corcoran 2005; Vettermann et Schlissel 2010).

I.3.3.1.4. Stade Petite Pré-BII (Pré-B tardif)

Après avoir proliféré, les grandes Pré-BII entrent en quiescence et deviennent les petites pré-BII. Les locus IgL_{λ} et IgL_{κ} deviennent alors disponibles (chromatine décondensée et accessible) mais les loci IgH restent clos (chromatine condensée et inaccessible). La réexpression de RAG1 et 2 permet le réarrangement des segments V_L vers J_L du locus IgL_{λ} ou IgL_{κ} via le même processus que pour le locus IgH (Figure 10) (Melchers et al. 2007).

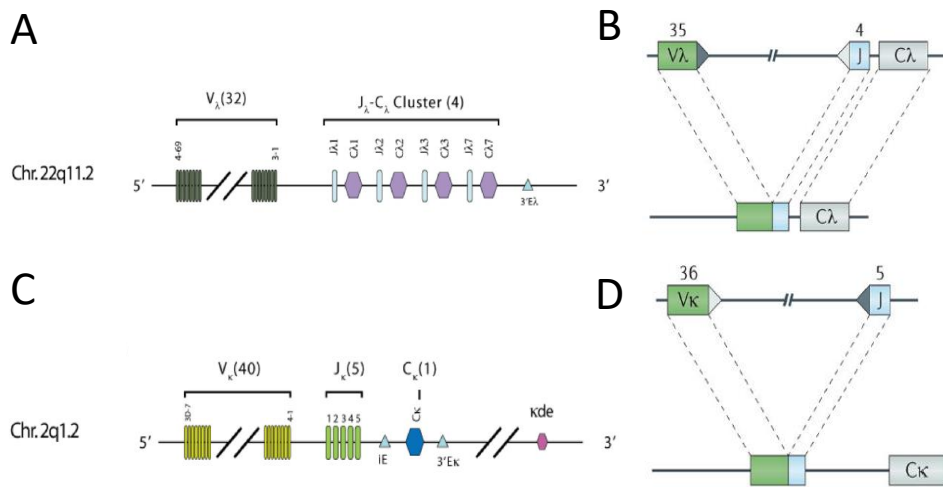


Figure 10 Représentation des réarrangements $V_{\lambda} \rightarrow J_{\lambda}$ et $V_{\kappa} \rightarrow J_{\kappa}$.

A : Locus de la chaîne $Ig\lambda$ sur le long bras q11.2 du chromosome 22. B : Schématisation des régions V_{λ} , J_{λ} , C_{λ} du locus de la chaîne $Ig\lambda$ et représentation du réarrangement $V_{\lambda} \rightarrow J_{\lambda}$. C : Locus de la chaîne $Ig\kappa$ sur le long bras q1.2 du chromosome 2. D : Schématisation des régions V_{κ} , J_{κ} , C_{κ} du locus de la chaîne $Ig\kappa$ et représentation du réarrangement $V_{\kappa} \rightarrow J_{\kappa}$. (Figure adaptée de (Schroeder et Cavacini 2010; Nemazee 2017)).

Le réarrangement de la chaîne légère IgL s'effectue avec le même principe que la chaîne lourde. Cependant les segments D sont absents des loci IgL_{κ} et IgL_{λ} . Un segment V est alors directement réarrangé avec un segment J pour former la chaîne légère $V_{\kappa}J_{\kappa}$ (IgL_{κ}) ou $V_{\lambda}J_{\lambda}$ (IgL_{λ}). Une fois produite elle remplace alors le SLC et forme le BCR. Les paratopes du BCR correspondent aux régions hypervariables déterminant la complémentarité ou « complementarity determining regions » (CDR1, CDR2, CDR3). Les régions CDR1 et 2 sont issues du segment du gène V des loci IgH et IgL . Les régions CDR3 sont issues de la jonction V-D-J du locus IgH et V-J du locus IgL (Figure 11) (Tonegawa 1983; Müller-Schiffmann et al. 2009).

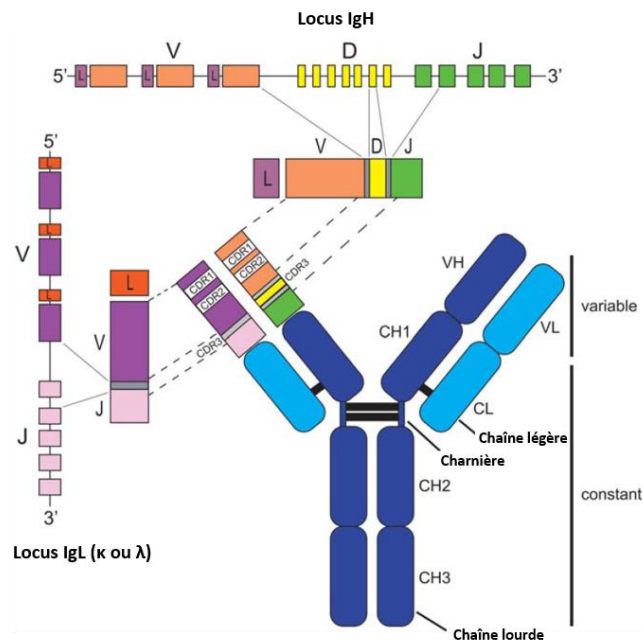


Figure 11 Schéma des CDR1, 2 et 3.
(Figure adaptée de (Boyd et Joshi 2014)).

Chez l'humain comme chez les rongeurs, le locus IgL_{κ} est réarrangé en premier. Si le BCR est auto-réactif, 3 mécanismes de tolérance déterminent l'avenir de la cellule. Si la signalisation du BCR est trop forte, la cellule meurt par apoptose (sélection négative). Cependant si la signalisation du BCR est intermédiaire l'expression des RAG n'est pas inhibée et permet l'« éditng », un second réarrangement s'effectue alors sur le deuxième allèle du locus IgL_{κ} . Après 2 échecs de recombinaison du locus IgL_{κ} , si le BCR est toujours auto-réactif, alors le locus IgL_{λ} est utilisé. Si l'« editing » échoue sur les 2 allèles des 2 loci, et que l'auto-réactivité n'est pas perdue, l'absence de signalisation du BCR entraîne l'arrêt du développement de la cellule B (anergie) leur permettant quand même de quitter la moelle osseuse (Wardemann et Nussenzweig 2007; Meffre et Wardemann 2008; Melchers 2015).

I.3.3.1.5. Stade B immature

La cellule B exprimant un BCR n'ayant pas encore rencontré d'Ag est alors appelée lymphocyte B immature. De plus, l'IgD commence aussi à être exprimée (Carrion et al. 2019). Cette expression n'est pas due à un réarrangement de l'ADN mais à un épissage alternatif de l'ARN pré-messager, qui donne un ARNm possédant la région C_{δ} . Ceci, permettant de produire une IgD ayant pour autant la même région V_H (Geisberger, Lamers, et Achatz 2006; K. W. Moore et al. 1981). Les cellules B immatures se trouvent encore dans la moelle osseuse. Elles deviennent des cellules B de transition lors de leur passage dans le sang pour arriver

dans la rate grâce à la chimio-attraction médiée par la sphingosine-1-phosphate (S1P), ce qui permet à la cellule de quitter le microenvironnement CXCL12/IL7 où elles sont retenues (Allende et al. 2010).

I.3.3.2. Différenciation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

I.3.3.2.1. Stade B de transition (T1-T2-T3)

De façon globale les cellules B de transition sont IgM+, IgD+. Il existe pour ces stades des différences entre l'humain et la souris (Tableau 2) (Vossenkämper et Spencer 2011).

Les cellules de transition T1 puis T2 ont été discriminées chez la souris grâce aux protéines de surfaces CD21 et CD23 notamment. Ces dernières n'étant exprimées qu'à partir du stade T2 (Loder et al. 1999). Les cellules de transition T3, se différencient par leur faible expression de l'IgM et semblent être en quiescence (Allman et al. 2001).

Chez l'humain le marqueur CD21 est aussi utilisé pour discriminer les stades T1 (CD21-) et T2 (CD21+) (Suryani et al. 2010). Le stade T3 discriminé par les marqueurs CD10-, CD24^{int}, CD38^{int}, contrairement à la souris, correspondrait chez l'humain à un stade post-T2, apte à se différencier en cellule B mature naïve (Palanichamy et al. 2009).

Tableau 2 Marqueurs des différentes cellules B de transition chez l'humain et la souris
Hi : « High », forte expression ; *Int* : Expression intermédiaire ; *lo* : « low », faible expression (Tableau adaptée de (Saito et al. 2003; Palanichamy et al. 2009; Weill, Weller, et Reynaud 2009; Descatoire et al. 2014)).

	T1	T2	T3
Marqueurs Humain	IgM+, IgD+		
	CD10 ^{Hi} , CD24 ^{Hi} , CD38 ^{Hi}		CD10-, CD24 ^{int} , CD38 ^{int}
	CD21-	CD21+	
Marqueurs Murins	T1	T2	T3
	IgM+, IgD+		IgM ^{lo} , IgD+
	CD21-, CD23-	CD21+, CD23+	

Parmi la population de cellules B de transition T2, il a été démontré que certaines cellules dont la voie NOTCH2 est activée sont adressées à la zone marginale chez la souris (Saito et al. 2003) mais aussi chez l'humain (Descatoire et al. 2014). Cependant une différence majeure entre ces deux espèces concerne la déplétion des cellules T2 auto-réactives. Chez l'humain, 40% des cellules sont éliminées à ce stade. Chez la souris les cellules T2 sont peu affectées par ce processus. La sélection des cellules T2 non auto-réactive est peu connue à ce jour, mais nous savons que l'expression à la surface et l'engagement du récepteur BAFFR joue un rôle majeur dans le passage au stade B mature naïf (Wardemann et Nussenzweig 2007; Melchers 2015).

I.3.3.2.2. Lymphocytes B-1a et B-1b

Les lymphocytes B1 ont été découverts chez la souris (Hayakawa et al. 1983), et depuis, leur existence demeure controversée chez l'humain. Il a récemment été démontré que les cellules souches hématopoïétiques humaines, provenant du sang ou de la moelle osseuse, étaient aptes à se différencier en lymphocytes B-1 lors d'une xénogreffe chez la souris, suggérant leur existence aussi chez l'humain (Kageyama et Katayama 2020). Chez la souris, les lymphocytes B1 aussi appelés « Leu-1 » se distinguent des lymphocytes B2 par l'expression de la protéine membranaire CD5. Elles ne font pas partie des cellules attirées dans les follicules, mais on les retrouve principalement dans les cavités (péritoine, intestins, poumons ...). Elles peuvent donner naissance à des cellules sécrétrices d'Ac sans avoir eu de contacts avec l'Ag ni de costimulation par les lymphocytes T CD4 et jouent donc un rôle dans la réponse immunitaire innée (Baumgarth 2017).

I.3.3.2.3. Lymphocyte B mature naïf

Les lymphocytes B matures naïfs, sont appelés ainsi car ils n'ont pas encore rencontré d'Ag. La rate et les ganglions attirent une grande majorité de ces cellules circulantes via la chimiokine CXCL13 produite par les cellules stromales. Les lymphocytes B naïfs exprimant le récepteur de la chimiokine CXCL13 (CXCR5) forment ensuite les follicules lymphoïdes primaires et secondaires où la concentration en CXCL13 est plus élevée. De plus, les cellules réticulaires fibroblastiques produisent aussi la protéine BAFF permettant de maintenir la formation du follicule (Figure 12) (I. C. MacLennan et al. 1990; Stebbeg et al. 2018).

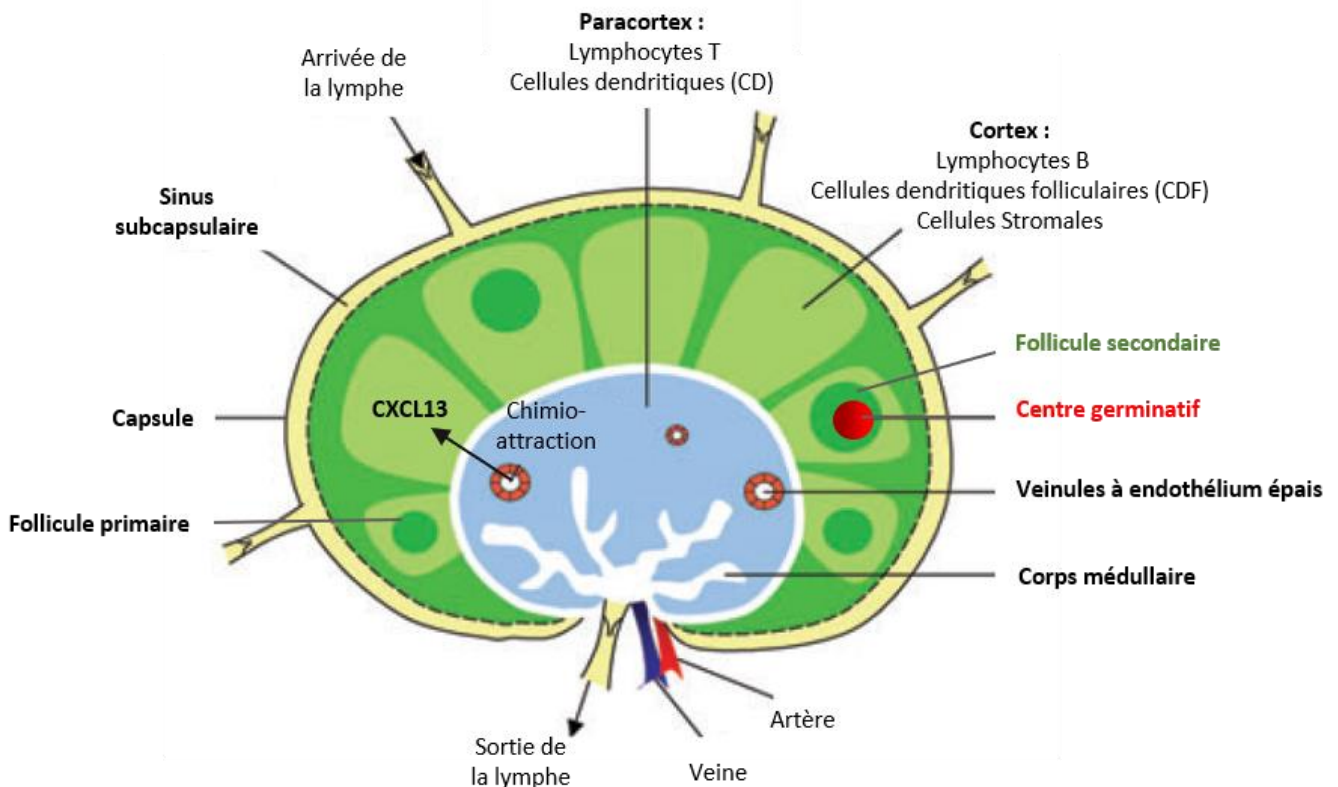


Figure 12 Schéma d'un ganglion lymphatique.
(Figure adaptée de (Drayton et al. 2006)).

I.3.3.2.4. Lymphocytes B-FO, B-Blast

Les lymphocytes B matures naïfs du follicule primaire, appelés cellules B folliculaires (B-FO), recirculent via le sang passant par la zone des cellules T (zone T) et/ou la lymphe en passant par le réseau de cellules dendritiques se situant entre la pulpe blanche et la pulpe rouge dans la rate ou au niveau du sinus subcapsulaire dans les ganglions lymphatiques (Figure 13) (I. C. MacLennan et al. 1990; Ian C M MacLennan 1994).

La réponse extra-folliculaire T dépendante (EF-TD)

Lors d'une activation modérée du BCR d'une cellule re-circulante dans le sang, la pulpe rouge (rate) ou le sinus subcapsulaire (ganglion), la cellule mature B blastique (B Blast) exprimant les récepteurs des chimiokines CCL19 (CCR7) et CXCR5 migre dans la zone des cellules B (zone B) en passant par la zone T sans aller dans le follicule (Stebegg et al. 2018). De même que l'activation d'un LT CD4 par une cellule dendritique dans la zone T entraîne la diminution de l'expression de CCR7 et l'augmentation de l'expression de CXCR5 permettant la migration des LT CD4 en périphérie de la zone B. Ainsi une coopération de la cellule B-T

CD4 peut s'établir. Au cours de cette réponse les 2 types cellulaires prolifèrent, les B blast se différencient ensuite en plasmablastes puis en plasmocytes IgM à courte durée de vie (IgH_v non muté). La formation de cellules B mémoires est cependant possible à faible taux pour la réponse EF-TD (Ian C. M. MacLennan et al. 2003; Jenks et al. 2019).

La réponse extra-folliculaire T indépendante (EF-TI)

La réponse peut aussi être T indépendante, notamment lorsque le BCR des cellules B blastiques capte des polysaccharides et autres molécules présentant des épitopes répétitifs. Les cellules B prolifèrent moins fortement, mais se différencient aussi en plasmablastes puis en plasmocytes à IgM de courte durée de vie (Shah et al. 2019). En principe, à la suite d'une réponse EF-TI, les B-Blast ne forment pas de lymphocytes B mémoires. Cependant, il en a déjà été observé en réponse aux dextrans ou au lipopolysaccharide (LPS) (Ian C. M. MacLennan et al. 2003; Jenks et al. 2019).

Les réponses EF-TD et TI permettent une production rapide d'Ac mais de plus faible affinité que la réponse T dépendante du centre germinatif (CG) (décrite ci-après).

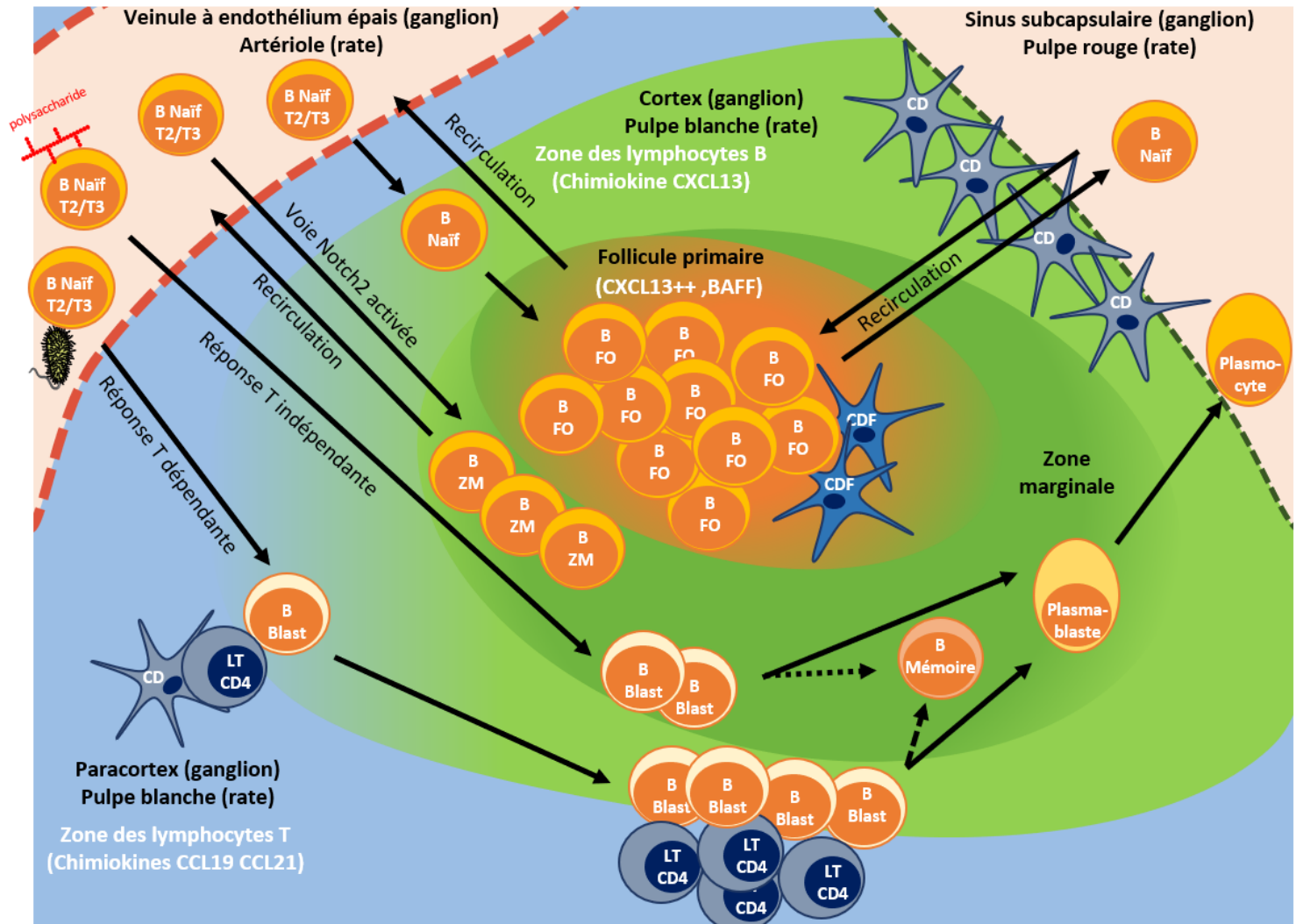


Figure 13 Schéma d'un follicule primaire et de la réponse extra-folliculaire T dépendante et indépendante. (Figure adaptée de (I. C. MacLennan et al. 1990; Ian C. M. MacLennan et al. 2003; Weill, Weller, et Reynaud 2009; Jenks et al. 2019; Shah et al. 2019)).

1.3.3.2.5. Lymphocytes B du centre germinatif (Centroblaste et Centrocytes)

Les cellules B circulantes possédant un BCR ayant une forte affinité pour l'antigène deviennent des B blastiques et migrent à la périphérie de la zone B, où la coopération T-B est essentielle à la forte expansion clonale (Figure 14) (Y. Zhang, Garcia-Ibanez, et Toellner 2016; Jenks et al. 2019). Les cellules B blastiques prolifèrent alors dans le follicule primaire jusqu'à confluence. Elles sont alors appelées centroblastes (CB) formant le centre germinatif (CG) du follicule secondaire. La formation du CG repousse les B-FO en périphérie qui forment alors la zone du manteau (I. C. MacLennan et al. 1990). BCL-6 est indispensable à la formation du CG (section 1.5.2.1.3). Les CB forment la zone sombre du CG et continuent leur maturation en subissant l'hypermutation somatique (SHM) c'est-à-dire l'acquisition de mutations au niveau des régions variables des Ig. Puis les CB se différencient en centrocytes (CC) qui forment la zone claire (Liu et al. 1992; Ian C M MacLennan 1994). Ces derniers coopèrent une seconde fois avec les lymphocytes T CD4 du follicule (LTF), activés par les cellules dendritiques folliculaires (CDF) qui présentent l'Ag sous forme de complexe immun, grâce à leur récepteur à la partie Fc de l'Ac. Les CC subissent un second processus de maturation : la commutation de classe ou « class switch recombination » (CSR), remplaçant la partie constante des Ig pouvant améliorer les propriétés effectrices des Ig. Ainsi le CC remplace l'expression d'une IgM par celle d'une IgA, IgG ou IgE. Pour ces deux processus (SHM et CSR) les CB et CC expriment l'enzyme « Activation Induced cytidine Deaminase » (AID). Au cours de la SHM ou de la CSR, si l'affinité du BCR pour l'Ag diminue, l'absence ou la faible signalisation du BCR entraîne l'apoptose de la cellule (sélection négative). Les CC devenus auto-réactifs sont également éliminés. A notre connaissance, les interactions entre la cellule et le microenvironnement du CG permettant cette surveillance sont inconnues (Küppers 2005; Melchers 2015; Y. Zhang, Garcia-Ibanez, et Toellner 2016). Après la CSR le CC produit alors plus de CXCR4 et peut revenir dans la zone sombre où les cellules stromales secrètent la chimiokine CXCL12. Une fois la cellule libérée des interactions avec la CDF et des LTF, elle peut poursuivre sa différenciation en plasmocyte ou en cellule B mémoire dans la zone marginale (ZM) (Mesin, Ersching, et Victora 2016).

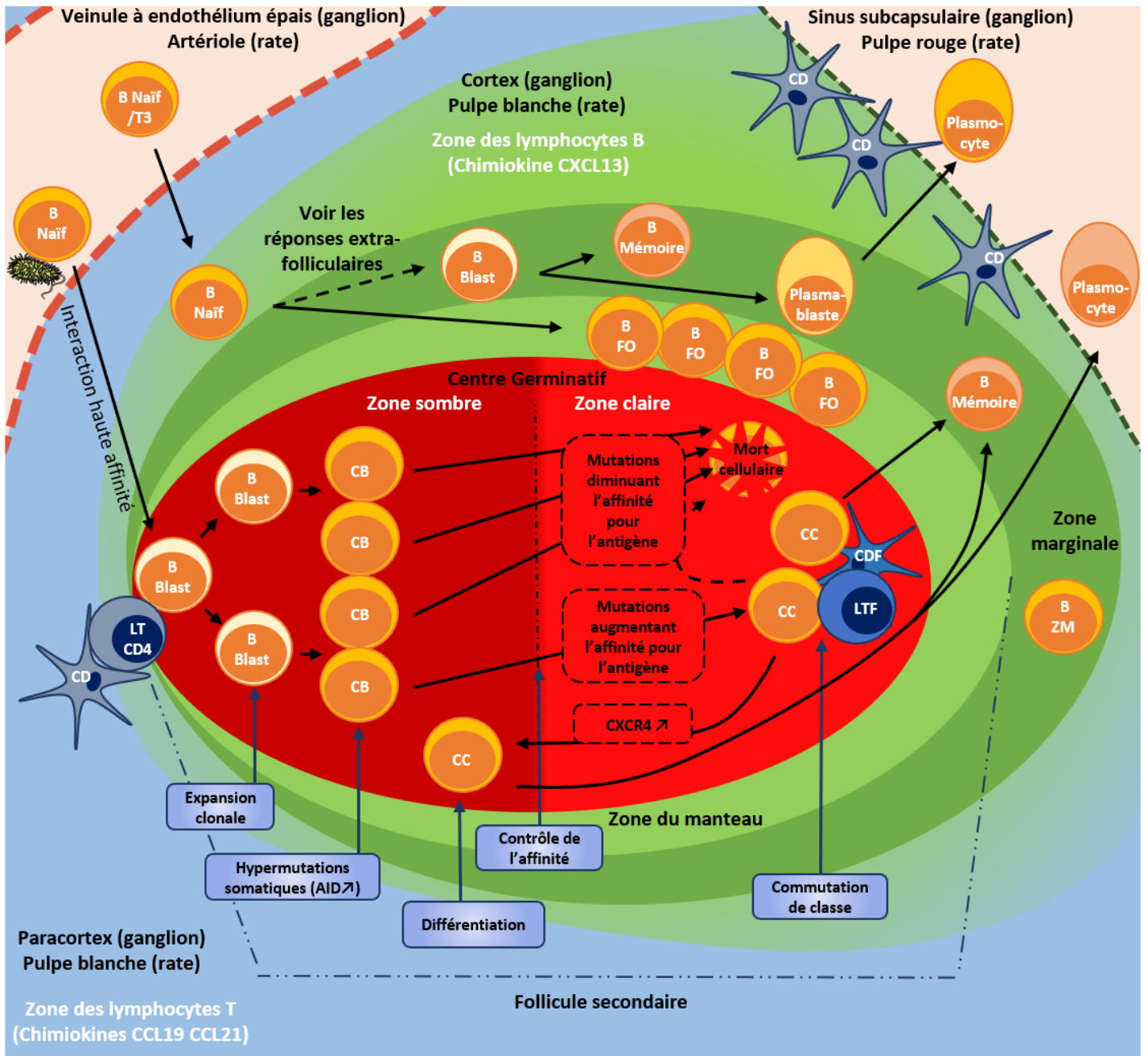


Figure 14 Schéma d'un follicule secondaire et de la réponse T dépendante du CG
 Maturation des lymphocytes B dans la rate ou le ganglion lymphatique (Figure adaptée de (I. C. MacLennan et al. 1990; Küppers 2005; Mesin, Ersching, et Victoria 2016; Kuka et Iannacone 2018; Sanz et al. 2019; Boothby, Hodges, et Thomas 2019; Grant et al. 2020)).

I.3.3.2.6. Lymphocyte B mémoire et B-ZM

Dans la rate, la zone marginale correspond à la zone en périphérie de la pulpe blanche. L'équivalent anatomique et fonctionnel de la ZM est la paroi interne du sinus sous-capsulaire des ganglions lymphatiques, dans l'épithélium de la crypte des amygdales et sous l'épithélium du dôme des plaques de Peyer dans les tissus lymphoïdes intestinaux. La ZM est le lieu où réside les cellules B issues de la réponse B extra-folliculaire T indépendante, les cellules B recirculantes dont la voie NOTCH 2 est activée (B-ZM) et les cellules B mémoires. Les cellules B-ZM (IgM^{hi}, IgD^{lo}, CD27+) sont aptes à recirculer et possèdent leur régions IgH_V réarrangées (Weill, Weller, et Reynaud 2009).

Les cellules B mémoires issues du CG, sont issues des CC ayant subi une forte expansion clonale, ayant subi la SHM et la CSR, possédant un BCR à haute affinité pour l'Ag et sont aptes à proliférer et se différencier plus rapidement (importance lors de la réponse immunitaire secondaire). Une fois réactivés, ils peuvent former de nouveaux plasmocytes ou ré-entrer dans le CG, entraînant la re-modulation de l'affinité de leur BCR (I.C.M. MacLennan et al. 1982; M Seifert et Küppers 2016). Les cellules B mémoires de la réponse extra folliculaire T indépendante sont issues d'une expansion clonale modérée, elles sont aussi faiblement mutées mais subissent fréquemment la CSR. Les cellules B mémoires IgM de la réponse extra-folliculaire T indépendante sont issues de cellules B très rarement hyper-mutées et commutées et ont donc une moindre affinité pour l'Ag. De plus les cellules B mémoires provenant des réponses extra-folliculaires sont bien moins nombreuses que celles issues du CG (Shah et al. 2019; Jenks et al. 2019).

I.3.3.2.7. Plasmocytes

Comme les cellules B mémoires, les plasmocytes sont issus de la différenciation de la réponse dépendante du CG ou des 2 types de réponse extra-folliculaires. Les plasmocytes à longue durée de vie, lorsqu'ils sont issus de la réactivation des cellules B mémoires (réponse immune adaptative secondaire) semblent être plus souvent commutés. Les plasmocytes commutés à longue durée de vie semblent ne provenir que de la réponse dépendante du CG et migrent dans la moelle osseuse (Shah et al. 2019), alors que les plasmocytes à IgM sont plus à même de résider dans la rate et sont aptes à proliférer y compris en l'absence de CG

(Bohannon et al. 2016). Les B mémoires à IgA et IgG semblent ne se différencier qu'en plasmocytes tandis que les B mémoires à IgM auraient le pouvoir de se différencier en plasmocytes ou de ré-entrer dans le CG (Dogan et al. 2009). La différenciation en plasmocyte se traduit notamment par l'expression de *BLIMP1* qui permet le rétrocontrôle négatif sur l'expression des facteurs de transcription *PAX5*, *BCL6* nécessaires au développement B dans le CG (CB et CC) et entraîne l'expression de *XBP1*, gène de la différenciation plasmocytaire (Shapiro-Shelef et Calame 2005; Mesin, Ersching, et Victora 2016).

I.4. Les lymphocytes de la régulation de la réponse immunitaire

Des processus de contrôle de l'homéostasie de la réponse immune adaptative à médiation cellulaire et humorale existent. Ce phénomène de rétrocontrôle est notamment assuré par les lymphocytes B et T régulateurs via la sécrétion de cytokines immunosuppressives mais aussi par des interactions cellule à cellule entraînant la mort des cellules effectrices de la réponse immune.

I.4.1. Les lymphocytes B régulateurs

La formation d'un lymphocyte B régulateur (Breg) est issue de l'activation immunitaire d'une cellule B via le récepteur CD40, le « toll like receptor » (TLR) et/ou le BCR ainsi que le CD80, CD86 et les récepteurs cytokiniques. Ils ciblent principalement les lymphocytes T CD4+, les LT CD8+ et les monocytes. Ces lymphocytes B régulateurs sont divisés en plusieurs sous catégories (Mauri et Menon 2015) :

- Cellule B immature : CD24^{hi}CD38^{hi}, exprimant l'IL-10, PD-L1, CD80, CD86, CD1d
- Cellule B10 : CD24^{hi}, CD27⁺, exprimant l'IL10
- Cellule GZMB⁺ : CD38⁺, CD1d⁺, IgM⁺, CD147⁺, GrB⁺, exprimant le GZMB, IL-10 et IDO
- Cellule Br1 : CD25^{hi}CD71^{hi}CD73^{lo}, exprimant l'IL-10 et IgG4
- Plasmablaste : CD27^{int}CD38^{hi}, exprimant l'IL-10
- iBreg : Exprime le TGFβ et IDO
- Cellule B TIM1 : CD19⁺, TIM1⁺, produisant de l'adénosine
- Autres : Cellules B CD39⁺ CD73⁺, exprimant l'IL-10

Les lymphocytes Breg ont une activité suppressive de la réponse immunitaire adaptative grâce à la sécrétion d'IL10 (marqueur de ce sous-type de lymphocyte B), de « Transforming growth factor β » (TGF- β), d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou encore du granzyme B (GZMB), ainsi qu'à l'expression des protéines de surface « Programmed Death Ligand 1 » (PD-L1 ou CD274), CD80, CD86, CD1d (Figure 15).

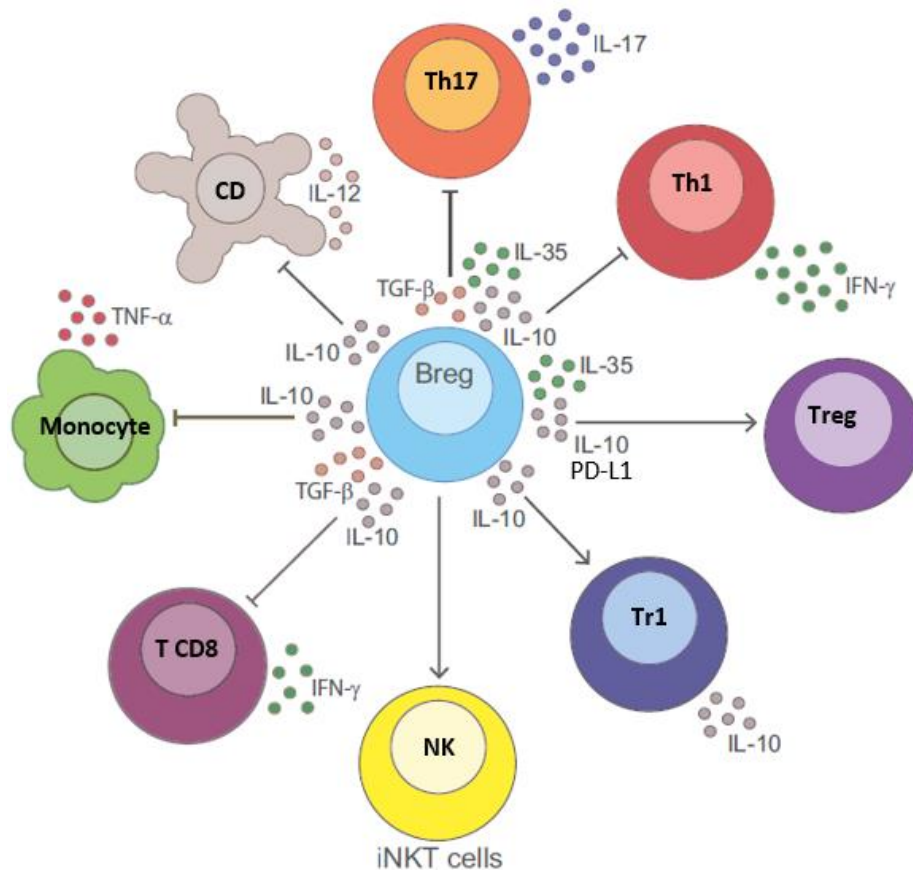


Figure 15 Schéma de l'action des cellules B régulatrices. (Figure adaptée de (Mauri et Menon 2015)).

I.4.2. Les lymphocytes T régulateurs

Au même titre que les lymphocytes Breg, les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont pour rôle de réguler négativement la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines et en exprimant des protéines de surface immunosuppressives. Il en existe aussi plusieurs sous-catégories mais toutes sont des cellules T CD4+ :

- Treg conventionnel : Foxp3+, CD39^{hi}, CD25+, Helios+, CTLA4+, LAG3+, GITR+
- Treg non conventionnel : Foxp3+, CD39^{hi}, CD25-, Helios+, CTLA4+, LAG3+, GITR+
- Th3 : Foxp3-, LAP+
- Tr1 : Foxp3-, CD49b+, LAG3+, CD226+
- B-Treg : Foxp3-, CD25+, LAG3+, ICOS+, PD1+, GITR+, OX40+

Ces Treg sont aptes à sécréter de l'IL-10, du TGF- β ainsi que la granzyme qui permettent la suppression de la réponse pro-inflammatoire des cellules NK, des cellules B, des cellules dendritiques et des macrophages. Une forte expression des molécules de surface CD39 et CD73 entraîne la transformation des molécules d'adénosine triphosphate (ATP) (médiateur de l'inflammation) en adénosine monophosphate (AMP) qui inhibe la prolifération des cellules de la réponse innée et adaptative via leur récepteur de l'adénosine (A2A). Les Treg conventionnels expriment fortement CD25 ce qui leur permet de capter une grande partie de l'IL2 dans le microenvironnement, le rendant moins accessible aux autres cellules de l'immunité. De plus, la forte expression de CTLA4 par les Treg engendre la diminution des protéines de costimulation CD80 et CD86 des cellules dendritiques (Figure 16) (Chien et Chiang 2017; Plitas et Rudensky 2016; Angerami et al. 2017; Zhou et al. 2009).

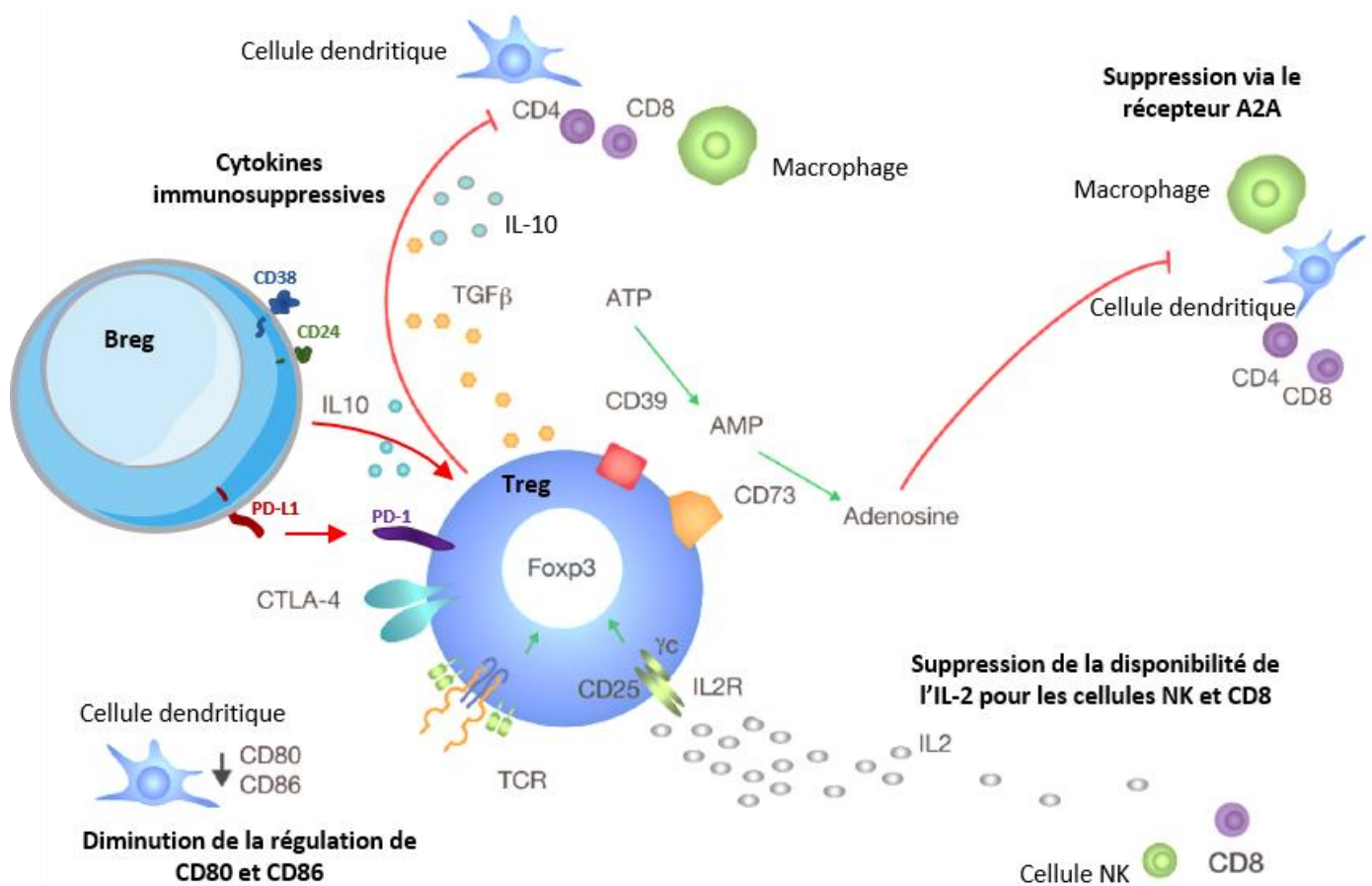


Figure 16 Schéma des mécanismes de l'immunosuppression des Treg et de l'induction par les Breg. (Figure adaptée de (Plitas et Rudensky 2016))

La différenciation en lymphocyte T régulateur dans le thymus résulte d'une haute affinité avec un peptide du soi couplé au CMHII ainsi que du récepteur à l'IL2. Les Treg en périphérie sont formés à partir de cellules T naïves exposées à un fort taux de TGF- β , acide rétinoïque, avec une stimulation antigénique dans des conditions tolérogènes (signalisation forte via le TCR mais costimulation non optimale). De plus une expansion des cellules Treg peut être observée via les récepteurs à l'IL-10 (IL10R) et PD-1. Ce dernier pouvant être activé par PD-L1 présent à la surface des cellules B régulatrices (Hsieh et al. 2006; Josefowicz, Lu, et Rudensky 2012).

I.5. Les grands principes de la lymphomagénèse B

I.5.1. Principes de classification des lymphomes B non Hodgkinien

Les lymphomes sont les cancers des cellules lymphoïdes, B, T ou NK. L'OMS a publié un premier classement de ces néoplasmes lymphoïdes en 2001, revu en 2008 et en 2016. Ce classement est issu d'un consortium entre hémato-pathologistes, généticiens, cliniciens et recense 56 entités de cancer liées du lymphocyte B (56 groupes homogènes de patients selon des critères hématologiques, biologiques et génétiques notamment). Les lymphomes à cellules B sont divisés en deux grandes catégories : Les lymphomes de Hodgkin (LH) comprenant 6 entités et les lymphomes non Hodgkinien à cellules B (LNHB) en comprenant 50 (Swerdlow et al. 2016).

Certains lymphomes sont dits indolents, d'autre agressifs selon leur vitesse de prolifération et certains peuvent débuter sous une forme indolente et se transformer en forme agressive par la suite. La contrepartie non tumorale des cellules B malignes peut aider à classer la plupart des lymphomes B. Les loci des Ig peuvent donner une information importante sur le stade de développement dans lequel a eu lieu la transformation de la cellule originelle, « cell of origin » (COO), selon le statut mutationnel des régions variables des Ig et de la commutation de classe. Leur séquençage aide ainsi à positionner le stade de différenciation B tumorale par rapport au CG (pré, per ou post CG) ou encore cellule B de la ZM (Küppers 2005; Bende, Smit, et van Noesel 2007).

Les différentes entités de LNHB sont cliniquement, phénotypiquement et génétiquement distinctes. Parmi ces lymphomes, 80% sont dérivés des cellules B du CG ou post CG (cellules dont le locus des Ig a subi la SHM). Comme exemples, citons le lymphome de Burkitt (BL), le lymphome folliculaire (LF), le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) et la macroglobulinémie de Waldenström (MW). Les cellules B du lymphome de Burkitt semblent dériver des cellules de la zone sombre tandis que les cellules B du LF et DLBCL de type CG semblent avoir stoppé leur différenciation dans la zone claire du CG lors de leur retour dans la zone sombre (DLBCL-GCB). D'autres peuvent être issus des cellules en sortie du CG voir post-CG comme les DLBCL à cellules B activées (DLBCL-ABC) (Basso et Dalla-Favera 2015). Les cellules de la MW, représentant la majorité des lymphomes lymphoplasmocytaires (LLP) peuvent être issues de petites cellules B matures, de lymphocytes plasmocytaires et de plasmocytes post-CG (Figure 17) (W. Wang et Lin 2020).

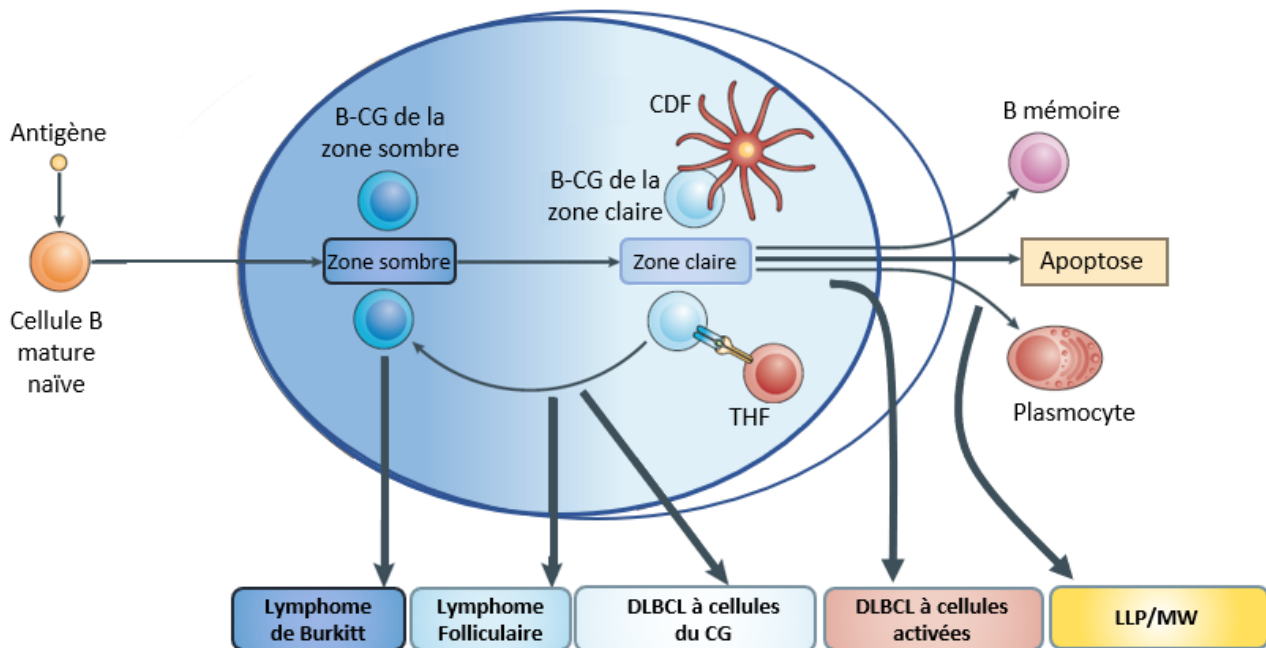


Figure 17 Représentation de la contrepartie non tumorale des cellules des LNH choisis en exemple. (Figure adaptée de (Basso et Dalla-Favera 2015)).

I.5.2. Les grands mécanismes de la transformation de la cellule B

I.5.2.1. Evènements liés à la maturation de l'Ig

Comme indiqué dans la 1^{ère} partie, la vie et la mort de la cellule sont organisées autour de la maturation des gènes des Ig dans le développement des cellules B. Ce processus est un facteur de danger pour l'intégrité du génome. Lors de la recombinaison VDJ ou de la CSR, la translocation d'un proto-oncogène (gène pouvant favoriser le développement d'une tumeur) peut remplacer un des gènes de la chaîne lourde ou légère des Ig, les régions régulatrices et les promoteurs des gènes des Ig (séquence d'ADN en amont d'un gène permettant le recrutement des protéines et l'expression du gène par ces dernières). Les régions régulatrices des gènes des Ig étant constitutivement actives, l'expression continue d'un proto-oncogène démasque son pouvoir oncogénique et entraîne la survie ou la prolifération de la cellule ayant subi cette aberration (Marc Seifert, Scholtysik, et Küppers 2013; Basso et Dalla-Favera 2015).

I.5.2.1.1. Altérations génétiques lors de la recombinaison VDJ : l'exemple de *BCL-2*

L'altération lors de la recombinaison VDJ est un évènement primaire (initiateur de l'émergence du cancer) dans le cas d'un LF. Cet évènement retrouvé dans environ 90% des cas, est la translocation t(14;18) du gène « *B cell lymphoma 2* » (*BCL2*) au niveau du locus IgH due à une erreur lors des réarrangements V(D)J médiés par les RAG (Figure 18).

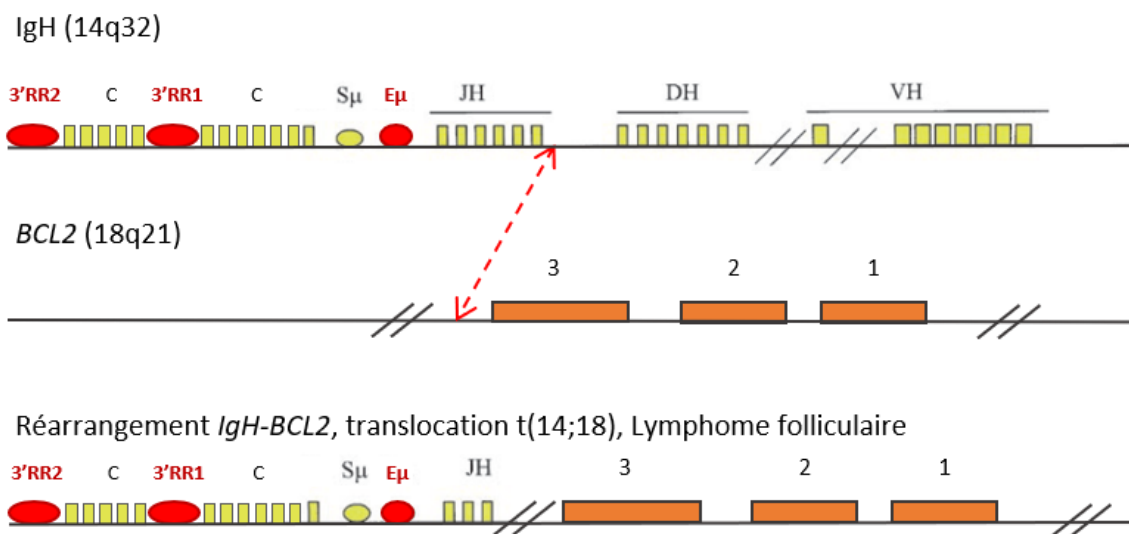


Figure 18 Représentation de la translocation t(14;18)

Représentation du Locus IgH, du gène *BCL2* et de la translocation t(14;18) pouvant avoir lieu lors des lymphomes folliculaires. Les segments de gènes des Ig sont représentés en jaune, les séquences régulatrices en rouges, les 3 exons de *BCL2* en orange (Figure adaptée de (Espinet et al. 2008))

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la maturation des lymphocytes dans le CG, l'apoptose est un mécanisme d'élimination des B du CG ayant un BCR moins affiné après la SHM. Les cellules B naïves et des cellules B mémoires expriment normalement *BCL-2* qui est nécessaire au développement. *BCL-2* est régulé négativement dans les cellules B du CG (Shen et al. 2004; Slomp et Peperzak 2018). Il a été démontré grâce aux modèles de souris transgéniques que l'expression inappropriée de *BCL-2* dans les cellules B, en rapport avec la translocation IgH/*BCL-2*, induit la survie et la prolifération des cellules B-FO (Timothy J. McDonnell et al. 1989) et perturbe la sélection des cellules B mémoires dans le CG (Smith et al. 2000). Cette translocation induit la surexpression de *BCL2* qui est une protéine anti-apoptotique permettant la survie non contrôlée du CC dans le centre germinatif (Lackraj, Goswami, et Kridel 2018).

I.5.2.1.2. Altérations génétiques lors de la CSR : l'exemple de c-MYC

Le lymphome de Burkitt est un bon exemple d'altération lors de la CSR médiée par l'AID. Il existe 3 formes de BL, toutes de grade agressif : BL endémique lié au virus d'Epstein Barr (EBV), BL sporadique et BL lié au virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les cellules malignes de ce lymphome ont les séquences des gènes IgV hypermutées (SHM) et une translocation chromosomique du proto-oncogène c-MYC (MYC) dans les loci IgH ou IgL dans 100% des cas de BL. Dans environ 80% des cas, il s'agit de la translocation t(8;14) et dans 20% des cas, la translocation t(2;8) ou t(8;22) (Figure 19). Cela suggère donc que cet évènement transformant se produit au cours de la CSR dans le CG (Schmitz et al. 2014; Basso et Dalla-Favera 2015).

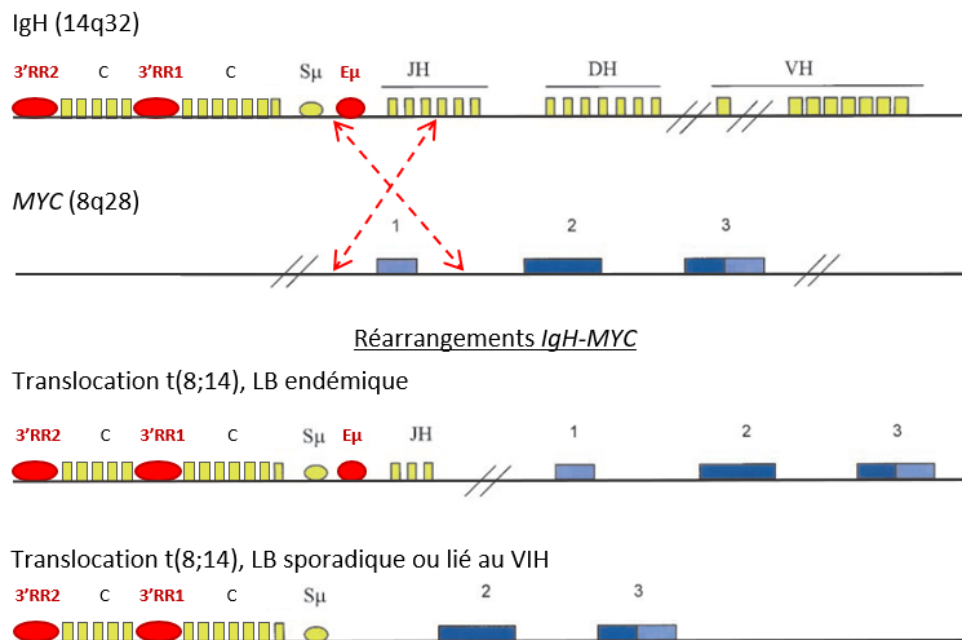


Figure 19 Représentation de la translocations t(8;14)
Représentation du Locus IgH, du gène c-Myc et de la translocation t(8;14) pouvant avoir lieu lors de lymphomes de Burkitt. Les segments de gènes des Ig sont représentés en jaune, les séquences régulatrices en rouges, les 3 exons de c-Myc en bleu et les parties non codantes en bleu clair (Figure adaptée de (Mosse et Weck 2010)).

L'exon 1 de c-MYC contient 2 promoteurs et n'est pas codant, les exons 2 et 3 codent la protéine avec une initiation de la traduction au nucléotide 16 de l'exon 2 (Figure 19) (Boxer et Dang 2001). La protéine MYC est une phosphoprotéine nucléaire qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation cellulaire. MYC régule la transcription des ARNm, mais aussi l'expression de microARN (miARN), comme notamment MIR-17 / 20a / 18a / 19a / 19b-1 / 92a-1 (Xiong et al. 2013). Dans le BL, l'expression de MYC

est directement sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes des Ig (E μ et 3'RR pour la chaîne lourde). La majorité des miARN anormalement exprimés entraînent une dérégulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la prolifération. *MYC* constitutivement exprimé entraîne aussi une dérégulation des facteurs de transcription jouant un rôle dans la transition G1/S, *CDKN1A*, *E2F1* et *E2F3* et confère à la cellule une forte prolifération entraînant des lymphomes de forme agressive (Robaina, Mazzocchi, et Esteves Klumb 2019; Giannuzzi et al. 2020).

I.5.2.1.3. Altérations génétiques lors de la SHM : l'exemple de *BCL-6*

Lors de la SHM, le ciblage par AID de gènes autres que les gènes variables des Ig (IgV) réarrangés, peut avoir pour conséquences d'introduire des mutations dans les régions 5' de gènes fortement exprimés. Parmi les LNHB et notamment les DLBCL, au moins 44 gènes différents ont été mis en évidence pouvant être la cible de la SHM, comme par exemple *BCL-6*, *BCL-2* ou encore *BTG2* (Khodabakhshi et al. 2012). Le facteur de transcription *BCL6*, régulant négativement *BLIMP1* est normalement exprimé par les cellules B du CG, et essentiel à la formation de ce dernier. Lors du développement des cellules B post-CG, *BCL-6* est régulé négativement permettant notamment l'expression *BLIMP1* nécessaire à la différenciation cellulaire. Dans tous les cas de DLBCL, une expression constitutive de *BCL-6* est observée. Dans 35 à 40% des cas a lieu une translocation du promoteur du gène *BCL-6* avec un promoteur plus fort de divers gènes t(3;Autre). Cependant, dans 75% des cas (quasiment exclusivement) d'autres altérations génétiques se produisent lors de la SHM. Cet événement ayant pour conséquence d'introduire un fort taux de mutations somatiques dans la partie 5' altérant les sites de liaison permettant sa régulation négative (Figure 20). Ainsi, l'expression de *BCL-6* par les cellules B post-CG n'est pas réprimée et entraîne alors la survie et la prolifération de la cellule B (Pasqualucci et al. 2003; Pasqualucci 2019).

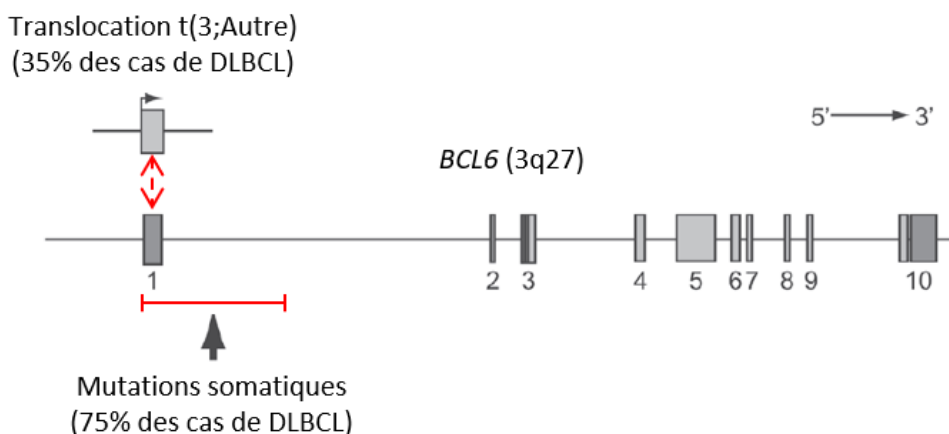


Figure 20 Représentation du gène *BCL6*, de la translocation t(3;Autre) et des mutations somatiques pouvant avoir lieu lors de DLBCL.
(Figure adaptée de (Pasqualucci et al. 2003)).

Les mécanismes de transformation de la cellule B liés à la maturation de l'Ig entraînent donc la surexpression par translocation des proto-oncogènes et/ou une altération de fonction due à des mutations somatiques. Cependant d'autres événements non liés à la maturation de l'Ig, comme l'introduction de mutations somatiques hors SHM, les délétions/amplifications, l'activation continue des cellules B, l'infection par un virus et l'échappement immunitaire peuvent participer à la lymphomagenèse.

I.5.2.2. Évènements non liés à la maturation de l'Ig

I.5.2.2.1. Altérations génétiques hors SHM

Pour garder l'exemple du LF vu précédemment, il a été constaté dans un premier temps chez la souris que la translocation *BCL2-IgH* ne permettait pas à elle seule, le développement d'un lymphome de type folliculaire (Timothy J. McDonnell et al. 1989) ce qui a été confirmé par la suite chez l'humain (Jäger et al. 2000; Ladetto et al. 2003). Cependant cet événement primaire permet de résister à la mort cellulaire, lui permettant d'accumuler plus d'altérations secondaires (Green et al. 2013). Indépendamment de la SHM, ces événements secondaires peuvent donc jouer un rôle dans la transformation maligne comme les mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeur *KMT2D* (*MLL2*) dans 60% des cas de LF, *CREBBP* (52.4%), *EP300* (19%) ou activatrices comme celles retrouvées sur l'oncogène *EZH2* (17%) (Kridel et al. 2016; Lackraj, Goswami, et Kridel 2018). Ces altérations entraînent un défaut dans la régulation des histones de la cellule (dérégulation épigénétique), comme la

méthylation médiée par KMT2D et EZH2 ou l'acétylation médiée par CREBBP et EP300 entraînant ainsi à leur tour l'accessibilité à la transcription de gènes permettant la prolifération et la survie de la cellule. Par exemple, chez la souris, la délétion de *Kmt2d* augmente le nombre de cellule du CG (J. Zhang et al. 2015) ; la délétion de *Crebbp* dans les cellules hématopoïétiques entraîne le développement d'un lymphome (Horton et al. 2017).

D'autres événements peuvent être responsables de la transformation d'un LF en lymphome agressif, les plus fréquents étant ceux impactant négativement *p53* (TP53) (section I.5.2.3), car la dérégulation de TP53 peut être étroitement liée à d'autres événements ayant lieu lors de la maturation de l'Ig.

Certaines mutations hors SHM peuvent aussi être la cause d'évènements primaires lors de lymphomes comme la mutation oncogénique MYD88^{L265P} dans 90% des cas de la MW. Cette mutation a pour conséquence l'activation du facteur de transcription NF-κB permettant d'augmenter la survie et la prolifération des cellules B (section I.6) (Baron et al. 2019).

I.5.2.2.2. Microenvironnement favorable

Du fait de la migration du lymphocyte B dans divers microenvironnement au cours de sa différenciation, l'émergence de LNHB peuvent être favorisé par activation continue et/ou défaut de surveillance immune.

Activation continue des cellules B : l'exemple du lymphome du MALT digestif

Le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) est un lymphome indolent à cellules B de la zone marginale extra-nodale. La cause de l'émergence d'un lymphome du MALT est une réaction immunitaire adaptative normale en réponse à une inflammation chronique dans les muqueuses gastriques de l'estomac en réponse à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Pereira et Medeiros 2014).

H. pylori est une bactérie pouvant coloniser sur une longue période les muqueuses gastriques. Présente au sein d'environ 59% de la population mondiale, elle est la cause des gastrites chroniques, asymptomatique dans la plupart des cas. Cependant, *H.pylori* peut être

à l'origine d'ulcères du duodénum (plaies dans la paroi de l'estomac) et de 2 types de cancers : l'adénocarcinome (tumeur épithéliale maligne) ainsi que le lymphome du MALT (Karkhah et al. 2019).

Une inflammation chronique prolongée induite par la bactérie peut entraîner la formation de cellules B auto-réactives ainsi qu'une transformation maligne de la cellule B. Les évènements favorisant la transformation de la cellule sont dans 15 à 40% des cas de MALT, la translocation *BIRC3-MALT1*, t(11;18) ; dans 20% des cas, la translocation *BCL10-IgH*, t(1;14), et dans 5% des cas la translocation *IgH-MALT1*, t(14;18). De plus, dans 15 à 30% le gène « *TNF Alpha Induced Protein 3* » (*TNFAIP3* ou *A20*) est invalidé à cause des délétions del(6q23). Ces 4 évènements sont impliqués dans l'activation anormale de NF-κB notamment via la voie du BCR (section I.7.2.1.1). Dans 50% des cas les traitements anti-microbiens aboutissent à une rémission complète du lymphome du MALT, indiquant que la réponse immune à *H. pylori* joue un rôle très important dans le maintien de la prolifération et de la survie des cellules malignes, notamment via l'engagement du BCR et de la coopération avec les T CD4 (Du 2016; Zucca et Bertoni 2016; Violeta Filip et al. 2018).

Conséquences de l'infection par un virus

Chez l'humain, 3 virus sont liés au LNHB, le virus d'Epstein Barr (EBV ou HHV4), le virus de l'hépatite C (VHC), l'herpesvirus humain de type 8 (HHV8) et un est lié au LNHT, le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1). Dans les LNHB, L'EBV est fréquemment associé notamment aux lymphomes post-transplantation (« post-transplant lymphoproliferative disease » ; PTLN), au LH, aux DLBCL et au lymphome de Burkitt (Shannon-Lowe et Rickinson 2019). Le (VHC) est associé au lymphome de la zone marginale (LZM) mais aussi aux DLBCL et au LF (Couronne et al. 2018). L'HHV8 est associé au lymphome primitif des séreuses (LPS) (Sunil, Reid, et Lechowicz 2010).

Présent dans plus de 90% de la population, l'EBV peut se répliquer dans l'épithélium buccal mais reste à l'état latent dans les cellules B durant toute la vie. Il est responsable de 200 000 cas de cancer par an à travers le monde. Pour exemple, à peu près 80% des PTLN sont liés à l'EBV et 50 à 65% ont une haute charge virale ; autrement dit, le virus est sous sa forme active et se réplique (Shannon-Lowe et Rickinson 2019).

Capable d'infecter et d'immortaliser le lymphocyte B, l'EBV est un virus à ADN circulaire double brin produisant une 100^{aine} de protéines virales. L'expression combinée de certains de ses gènes permet à ce virus de rester silencieux (Latence 0), de proliférer, d'infecter ou de lyser les cellules (Latence I, II et III). La latence 0 est le programme de quiescence du virus. Le système immunitaire est donc incapable de détecter la présence du virus, ce qui lui permet de persister dans les cellules B mémoires servant alors de réservoir. En latence 0, uniquement les micro-ARN *EBERs* et *BART* sont produits (les micro-ARN *EBERs* et *BART* étant des petits ARN non codants permettant la régulation de certains gènes). La latence I est définie par la production du facteur de transcription *EBNA1* qui permet le maintien de l'épisome de l'EBV en plus des micro-ARN de la latence 0 (*EBERs* et *BART*). La latence II est complétée par l'expression des protéines membranaires *LMP1*, *LMP2A/2B* transducteurs de signal. La latence III correspond à la production de l'ensemble des protéines de latence, les facteurs de transcription *EBNAs 2, 3A, 3B, 3C* et *LP*, la protéine *BHRF1* inhibant l'apoptose (un homologue de l'oncogène *BCL2*), ainsi que les gènes exprimés lors de la latence II (*LMP1*, *LMP2A/2B*, *EBNA1*, *EBER* et *BART*). Parmi ces gènes *LMP1*, exprimé lors de la latence II et III permet d'activer le facteur de transcription NF- κ B jouant un rôle dans la survie et la prolifération (section I.7.2.1.5) (Shannon-Lowe et Rickinson 2019).

L'infection asymptomatique par l'EBV survient le plus souvent pendant l'enfance via la salive. Chez l'adulte, l'infection peut être responsable de la mononucléose infectieuse, une maladie lymphoproliférative bénigne (Williams et Crawford 2006). Les premières cellules à être infectées par l'EBV sont à ce jour encore discutées. La première hypothèse serait que l'EBV infecte d'abord les cellules épithéliales où il se réplique, avant d'être libéré pour infecter les cellules B colocalisées dans les structures lymphoépithéliales. La deuxième hypothèse suggère que l'EBV pénètre dans les cryptes du lymphoépithélium des amygdales via la salive, traverse la barrière épithéliale et infecte directement les cellules B naïves. Les glycoprotéines du virus lui permettent de rentrer dans la cellule hôte via ses récepteurs. Dans le cas des cellules B, ce sont les glycoprotéines gp350/220 et gp42 de l'EBV qui adhèrent respectivement aux CR2/CD21 et CMHII. L'infection des cellules épithéliales, quant à elle, n'est pas encore bien comprise. Les glycoprotéines de l'EBV, gH et gL, adhèreraient au récepteur gHgL ou aux récepteurs d'adhésion cellulaire (intégrines $\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$), ou encore, découvert plus récemment, au récepteur « ephrin A2 » (EphA2) (H. Zhang et al. 2018).

Dans le modèle proposé par Tonoyan, l'EBV infecte dans un premier temps les cellules épithéliales oropharyngées où il se réplique lytiquement. Une fois l'EBV libéré dans les tissus lymphoïdes, il peut ensuite infecter les cellules B sous-jacentes et utiliser toutes les protéines de la latence III induisant la prolifération des cellules B infectées. Chez un patient sain, les cellules T « helpers » (CD4), cytotoxiques (CD8) et les cellules NK éliminent la très grande majorité des lymphocytes B infectés proliférants. Cependant, les quelques cellules survivantes passent dans le centre germinatif où elles n'expriment que les protéines de la latence II. Par la suite, lorsque les cellules B matures migrent dans le sang, l'EBV passe en latence 0 (état immunologiquement silencieux), constituant un réservoir stable dans les cellules B mémoires. L'expression intermittente d'EBNA1 (latence I) permet au génome viral d'être ségrégué avec les chromosomes lors de la réplication des cellules hôtes. Les cellules B mémoires peuvent rester quiescentes, être recrutées par le CG ou retourner dans les tissus lymphoïdes et se différencier en plasmocytes activant alors le cycle lytique viral. L'EBV ainsi répliqué peut être excrété et rejoindre la salive afin de réinfecter l'hôte ou être transmis, cela durant toute la vie (Figure 21) (Tonoyan et al. 2019).

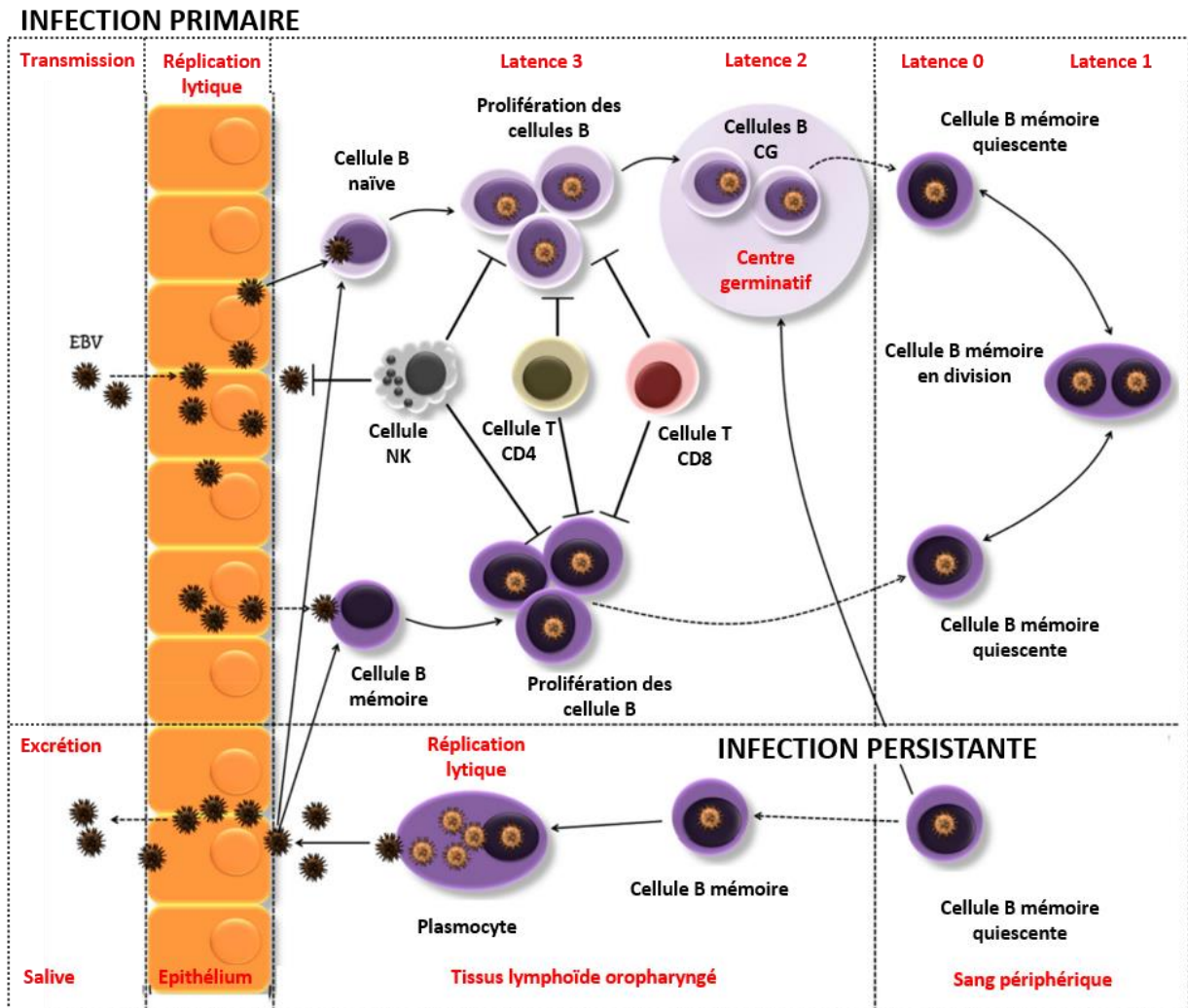


Figure 21 Schéma du modèle actuel d'infection primaire et persistante de l'EBV proposé par Tonoyan et al., (Figure adaptée de (Tonoyan et al. 2019)).

En infectant les lymphocytes T CD4, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est la cause d'une atténuation de la surveillance antitumorale. La réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques à l'EBV est essentielle à la répression des cellules immortalisées par le virus chez les individus en bonne santé. Lorsque la réponse immunitaire adaptative diminue lors de cas d'infection par le VIH, ou encore due à des traitements immunosuppresseurs chez les patients receveurs d'une transplantation, la prolifération des lymphocytes B immortalisées par l'EBV n'est plus contrôlée (Nijland et al. 2015), favorisant l'apparition du LH et des LNHB comme le lymphome de Burkitt, les DLBCL ou le lymphome primitif du système nerveux centrale (SNC) associé à l'EBV (Re, Cattaneo, et Rossi 2019).

Echappement immunitaire des lymphomes B

L'EBV met en exergue un phénomène général, celui du contrôle de l'émergence d'un LNHB par le système immunitaire. Ainsi le système immunitaire exerce une pression de sélection favorisant les cellules ayant acquis des mécanismes d'échappement :

- Echappement par altération de la présentation de l'Ag

Un des mécanismes de l'échappement immunitaire concerne la diminution de la production du CMHI. Dans certains cas, une altération génétique peut entraîner la perte de fonction de la protéine B2M qui est importante lors de l'assemblage du CMHI, ou encore la perte de CD58 (LFA-3) qui lie le CD2 présent à la membrane de la cellule T et permet l'optimisation de la reconnaissance du CMH (Challa-Malladi et al. 2011). De plus, l'expression du CMHII peut aussi être impactée de la même manière avec la translocation inactivatrice de *CIITA* (régulateur positif de la transcription de *CMHII*) (Steidl et al. 2011). Le CMHI non classique (HLA-G) connu pour son rôle dans la tolérance immunitaire fœto-maternelle, quant à lui, peut être surexprimé par les cellules tumorales de certains lymphomes. Le HLA-G, corégulé avec le CMHI, est une molécule tolérogène qui inhibe la cytolyse médiée par les cellules NK ou les LT CD8 (Rizzo et al. 2014). Bien que non relié stricto sensu à la présentation de l'Ag, la perte de fonction du récepteur FAS/CD95 qui, en temps normal, entraîne l'apoptose lorsqu'il est activé par son ligand FASL/CD95-L présent sur les cellules T, a également été observée (Figure 22) (Maurus et al. 2018).

- Echappement par inhibition de la réponse immune

Comme évoqué pour les Breg et les Treg, les mécanismes d'inhibition les plus connus de la réponse immune dans les lymphomes sont liés aux protéines membranaires CD70, PD-L1 (B7-H1/CD274) et autres protéines de la famille B7 qui peuvent être surexprimées par les cellules malignes. L'activation des récepteurs respectifs de ces 3 ligands, CD27, « programmed cell death 1 » (PD-1/CD279) et « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA4/CD152), ont pour conséquence d'anergiser les cellules T (Lens et al. 1999; Stamper et al. 2001). La surexpression de PD-L1 peut être la conséquence d'une aberration génétique mais aussi de l'infection par un virus (EBV, HHV8) (Durand-Panteix et al. 2012; B. J. Chen et al. 2013). De ce fait, nous savons que les cellules immortalisées par l'EBV miment phénotypiquement et fonctionnellement les Breg, et que la protéine LMP1 de la latence II et III

de l'EBV permet de détourner la signalisation du récepteur CD40, activant le facteur de transcription NF- κ B, et surexpriment *PD-L1* (Auclair et al. 2019; Vincent-Fabert et al. 2019).

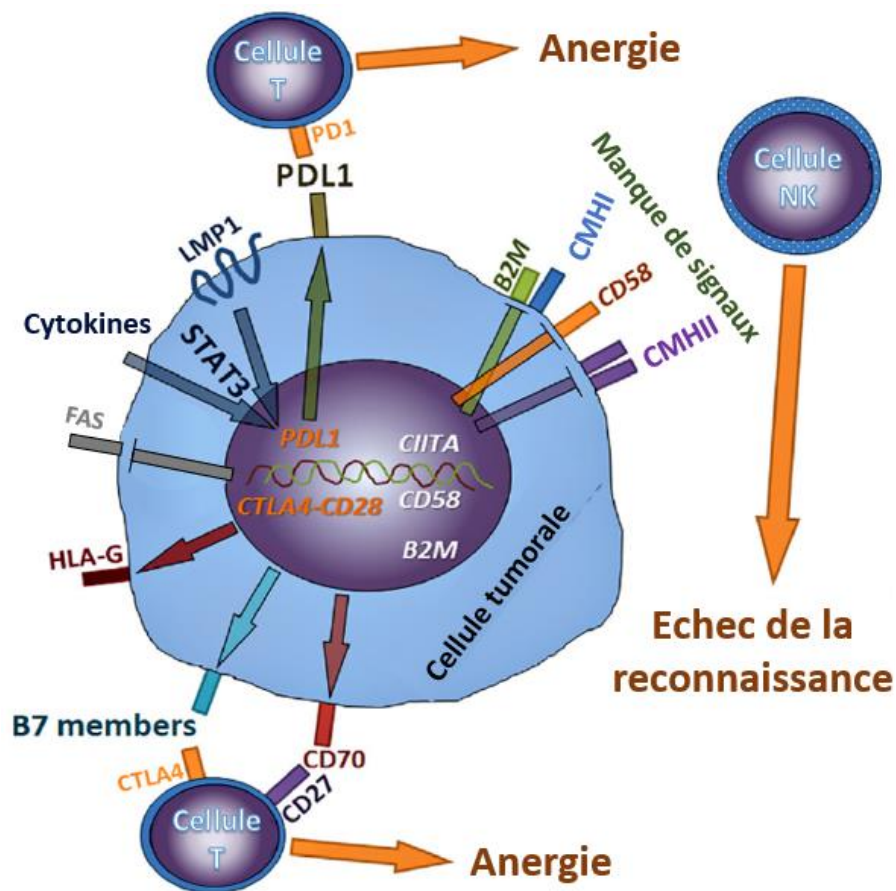


Figure 22 Schéma des principaux mécanismes d'échappement immunitaire des cellules tumorales. (Figure adaptée de (Menter et Tzankov 2018))

1.5.2.3. Évènements liés à la transformation en lymphome agressif : la synergie entre les oncogènes

Les lymphomes indolents peuvent dans certains cas se transformer en lymphomes agressifs via l'accumulation d'événements liés et non liés à la maturation de l'Ig, se traduisant par une prolifération plus élevée des cellules malignes, une résistance aux traitements et un mauvais pronostic. Ce phénomène est observé le plus fréquemment parmi les cas de LF, avec 2 à 3% des cas se transformant en lymphome agressif (DLBCL) tous les ans (Fischer et al. 2018). Comme déjà cité en section 1.5.2.2.1, certains événements secondaires comme l'altération des gènes *EZH2*, *MLL2*, *CREBBP* ou *EP300* contribue à l'émergence du LF. C'est grâce à la comparaison des données génomiques des cellules de LF et de LF transformés

(LFt) que des événements permettant la transformation en lymphome agressif ont pu être mis en évidence. Les plus fréquentes sont : Les délétions, la perte d'hétérozygotie ou les mutations impactant négativement *p53* (*TP53*) ; les délétions et/ou la perte d'hétérozygotie de *CDKN2A* ; la translocation, amplification de *MYC* (Kridel, Sehn, et Gascoyne 2017). L'aberration la plus fréquente est la perte du suppresseur de tumeur *CDKN2A* qui est un régulateur négatif de l'entrée en cycle G1 de la cellule et stabilise l'activité d'un autre suppresseur de tumeur, *TP53*. Dans les LFt, il est aussi fréquemment observé une surexpression de *MYC*, avec dans de plus rare cas une association avec la translocation *BCL-2* caractérisée comme lymphome « double-hit » de plus mauvais pronostic. La synergie *BCL-2-cMYC* a été démontrée dans les années 90 (T. J. McDonnell et Korsmeyer 1991). Encore moins fréquemment observée, l'association de la translocation de *BCL-6* avec les 2 aberrations précédentes caractérise les lymphomes « triple-hit » (*MYC/BCL-2/BCL-6*) avec un encore plus mauvais pronostic (Pasqualucci et al. 2014; Fischer et al. 2018).

I.6. La protéine MYD88

C'est en 1990 lors de l'étude de la différenciation myéloïde induit par IL6 chez la souris, que le gène *Myd88*, pour « myeloid differentiation primary response 88 », a été décrit pour la première fois (Lord, Hoffman-Liebermann, et Liebermann 1990). Ce dernier est localisé en position p22 du chromosome 3 chez l'humain. L'étude de sa séquence protéique en 1994 a permis de mettre en évidence l'homologie de son domaine cytoplasmique avec le récepteur Toll mis en évidence chez la *Drosophile* (Gay et Keith 1991) et le récepteur à l'IL-1 (IL-1R) chez les mammifères (Hultmark 1994). Ainsi le domaine Toll-IL-1R (TIR) en C terminal peut interagir avec d'autres protéines possédant ce même domaine comme la protéine adaptatrice MAL ainsi que les récepteurs TLRs, décrits ci-après (Z. Lin et al. 2012). Le domaine appelé « death domain » (DD) en N terminal permet la liaison avec les protéines de la famille IRAK (Figure 23) (Deguine et Barton 2014).

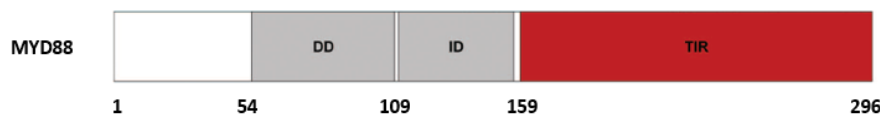


Figure 23 Représentation de la structure de la protéine MYD88. Domaines fonctionnels : « Death domain » (DD) en N terminal, le domaine intermédiaire (ID), et le domaine « Toll-IL-1 receptor » (TIR) en C terminal (Figure adaptée de (Rossi 2014)).

I.6.1. Les récepteurs recrutant MYD88

L'immunité innée met en jeu des récepteurs capables de reconnaître certains motifs du non soi provenant de pathogènes, appelés « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs). Ces PAMPs peuvent être des molécules bactériennes comme les lipoprotéines diacylées ou tryacylées, le LPS, la flagelline, les régions d'ADN riches en CpG non méthylés, mais aussi des molécules virales, l'ARN simple brin (ARNsb) ou double brin (ARNdb). Les récepteurs reconnaissant ces PAMPs sont appelés « pattern-recognition receptors » (PRRs) parmi lesquels on retrouve les récepteurs cytoplasmiques « leucine-rich repeats » (NLRs), « retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors » (RLRs) et les récepteurs membranaires « toll-like receptors » (TLRs) (Loiarro, Ruggiero, et Sette 2010; Kawai et Akira 2009). Parmi ces PRRs, les TLRs sont capables d'activer le complexe NF- κ B et la voie des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK). Ce sont des glycoprotéines membranaires dont le domaine extracellulaire est composé d'un nombre variable de régions riches en leucine (LRR). La partie intracellulaire du TLR possède un domaine de signalisation cytoplasmique TIR

(Akira, Uematsu, et Takeuchi 2006). Chez l'humain il existe 10 protéines dans la famille des TLR (TLR1 à 10) capables de se lier aux différents PAMPs. Lorsqu'un TLR est activé, le changement de configuration rend son domaine cytoplasmique TIR accessible à une protéine possédant un adaptateur contenant aussi un domaine TIR. Ces dernières sont au nombre de 5 : MYD88, « MyD88 adaptor-like » (MAL, TIRAP), « Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β -related adaptor molecule » (TRAM), « Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β » (TRIF) et « sterile α -motif and armadillo motif-containing protein » (SARM).

Avant de pouvoir se lier à MAL et MYD88 via leur domaine TIR, le TLR2 s'associe avec le TLR1, 6 ou 10, le TLR7 avec le TLR8. Les TLR9 et 4 forment un homodimère, cependant le TLR4 nécessite la présence de « myeloid differentiation factor-2 » (MD2) autrement appelé « lymphocyte Antigen 96 » (LY96). Le TLR5 qui lui aussi est actif sous forme d'homodimère peut se lier directement à MYD88. Le TLR3 formant un homodimère se lie directement à TRIF et l'homodimère TLR4 une fois endocyté peut se lier à TRAM et TRIF. SARM qui est aussi une protéine possédant un adaptateur contenant un domaine TIR, est un inhibiteur de TRIF. Les TLRs une fois complexés recrutent la protéine « IL-1R associated kinase 4 » IRAK4 (Figure 24) (Ullah et al. 2016).

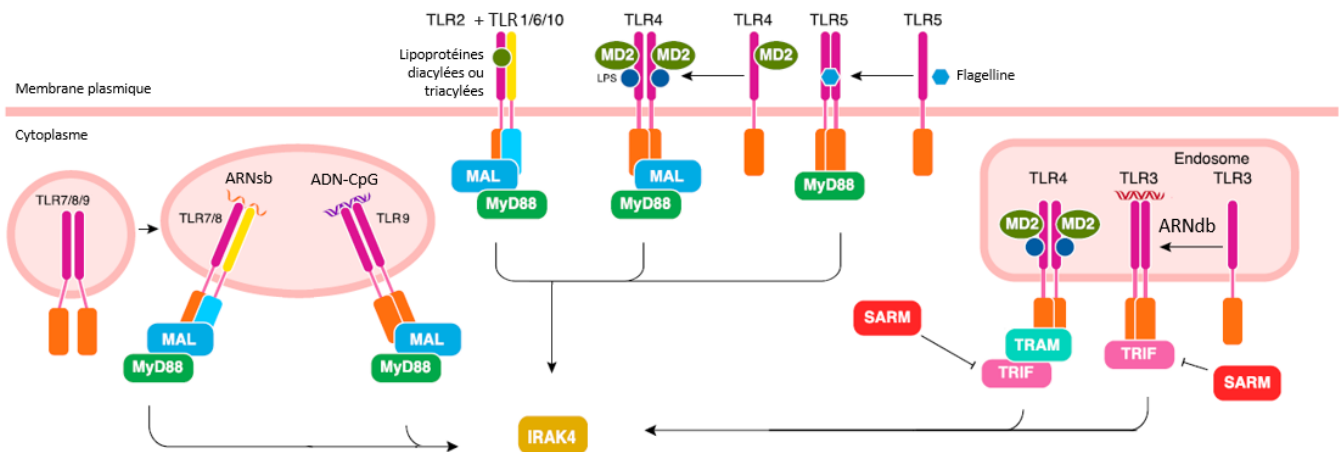


Figure 24 Schéma des récepteurs TLR/IL-1R et protéines à domaines TIR. Protéines à domaines TIR (MAL, MYD88, TRAM, TRIF et SARM) activant IRAK4 de la voie de signalisation des TLRs humain ainsi que leurs ligands respectifs (Figure adaptée de (Ullah et al. 2016)).

Après le recrutement de la protéine IRAK4 via son domaine DD, IRAK4 recrute et phosphoryle IRAK1 et 2 et forment le « myddosome » (S.-C. Lin, Lo, et Wu 2010). Lors de l'activation des TLRs 1, 2, 4, 5, 6, l'interaction du myddosome avec « TNF Receptor Associated Factor 6 » (TRAF6) permet ensuite l'ubiquitination et l'activation du complexe TAK1/TAB (Xia et al. 2009). TAK1 ayant la capacité d'activer la voie canonique de NF- κ B (p65/p50) et MAP Kinases. Les MKK4/7, MKK3/6 et MKK2 activent respectivement les protéines JNK, p38 et

ERK et permettent le passage du facteur de transcription AP-1 dans le noyau permettant l'expression de cytokines inflammatoires. La voie NF- κ B est détaillée plus précisément dans la partie lui étant dédiée (section I.7). Lors de l'activation des TLRs endosomaux 7, 8 et 9 le myddosome interagit avec TRAF3 pour activer IKK ϵ et TBK1 ayant pour conséquence la phosphorylation du facteur de transcription « interferon-regulatory factor 7 » (IRF7) qui promeut l'expression d'IFN α (Figure 25) (J. Q. Wang et al. 2014).

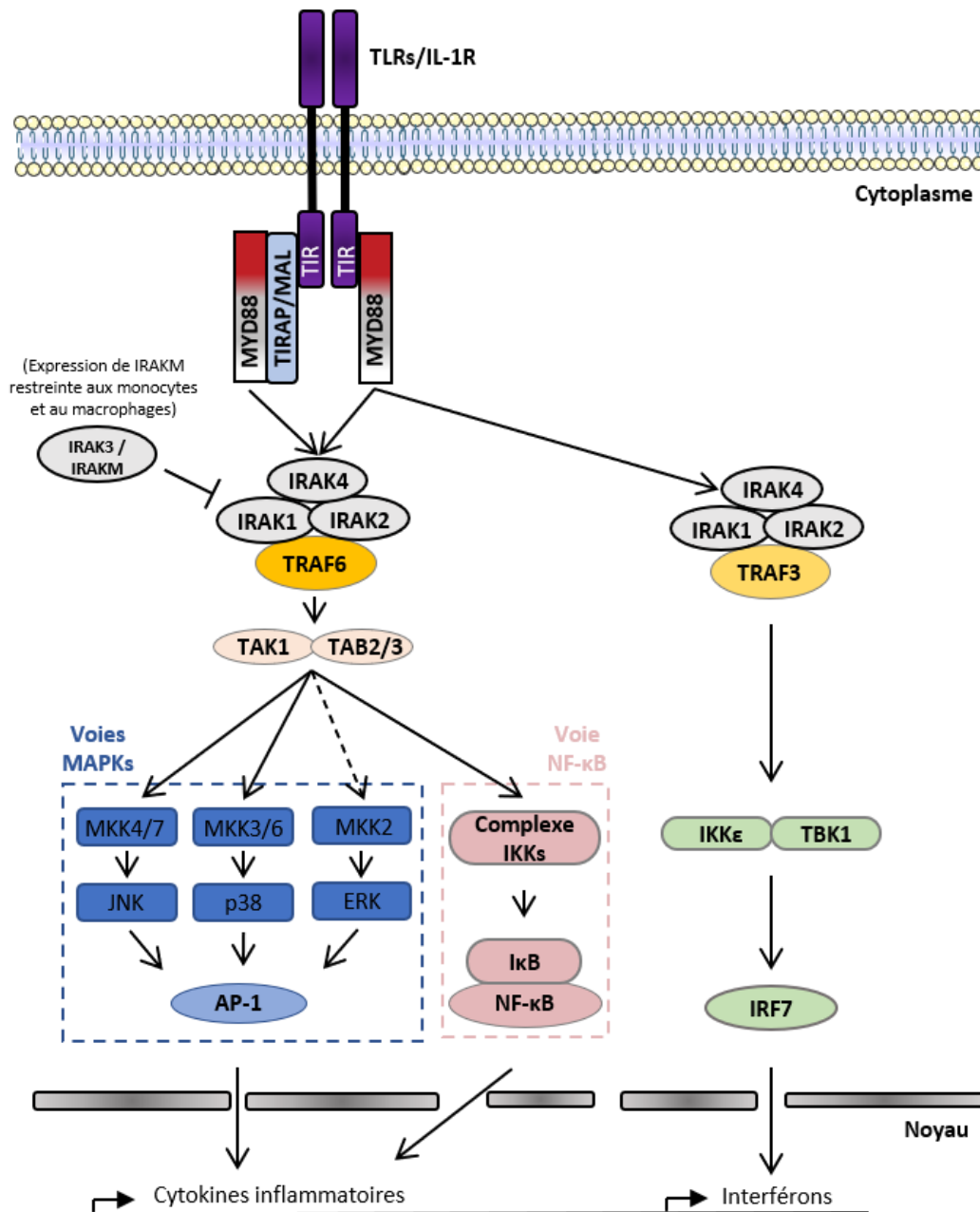


Figure 25 Schéma de la signalisation cellulaire dépendante de MYD88 des récepteurs TLRs/IL-1R. (Figure adaptée de (J. Q. Wang et al. 2014)).

I.6.2. Mutations de MYD88 dans les lymphomes

Des mutations récurrentes ont été retrouvées sur la protéine MYD88 lors des cas de ABC-DLBCL, GCB-DLBCL, BL et MALT (Figure 26). La mutation la plus fréquente est la substitution L265P, cette dernière modifie la configuration du domaine TIR de la protéine lui permettant de se complexer spontanément à IRAK4 et IRAK1 et activant constitutivement le facteur de transcription NF- κ B (Ngo et al. 2011).

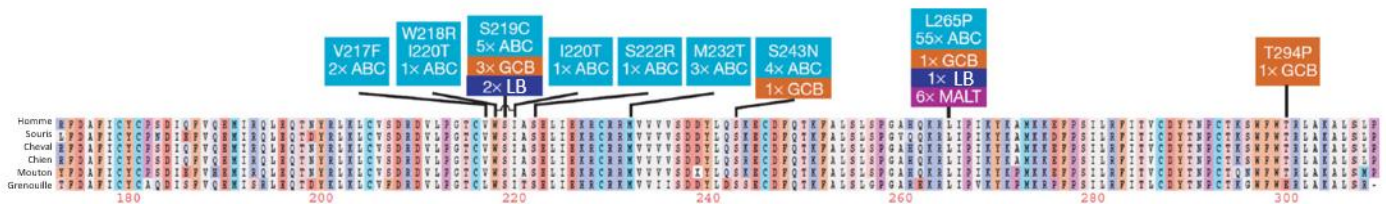


Figure 26 Représentation de la séquence d'acides aminés de la protéine MYD88 et des mutations récurrentes lors des DLBCL-ABC/GCB, BL, MALT

(Homme, souris, cheval, chien, mouton, grenouille) (Figure adaptée de (Ngo et al. 2011)).

Décrit initialement par Ngo *et al.*, dans les DLBCL de type ABC (Ngo et al. 2011), en 2012 l'équipe de Treon *et al.*, découvre que la mutation MYD88^{L265P} est présente dans 91% des cas de macroglobulinémie de Waldenström (MW) (Treon et al. 2012), rapidement confirmé par notre laboratoire (Gachard et al. 2013). Par la suite, les résultats des études de nombreux cas de patients atteints de lymphomes B différents ont permis de mettre en évidence plus exactement la fréquence de la mutation MYD88^{L265P} dans la MW (87%), le DLBCL du système nerveux central (SNC ; 70%), le DLBCL cutané de type jambe (TJ ; 54%), la gammopathie monoclonale à de signification indéterminée (MGUS) à IgM (52%), le DLBCL testiculaire primitif (LTP ; 73%) et le DLBCL ABC (24%). Cette étude permet de mettre en valeur la présence de la mutation MYD88^{L265P} essentiellement dans les lymphomes ayant pour origine cellulaire les cellules B activées (Figure 27) (X. Yu et al. 2018).

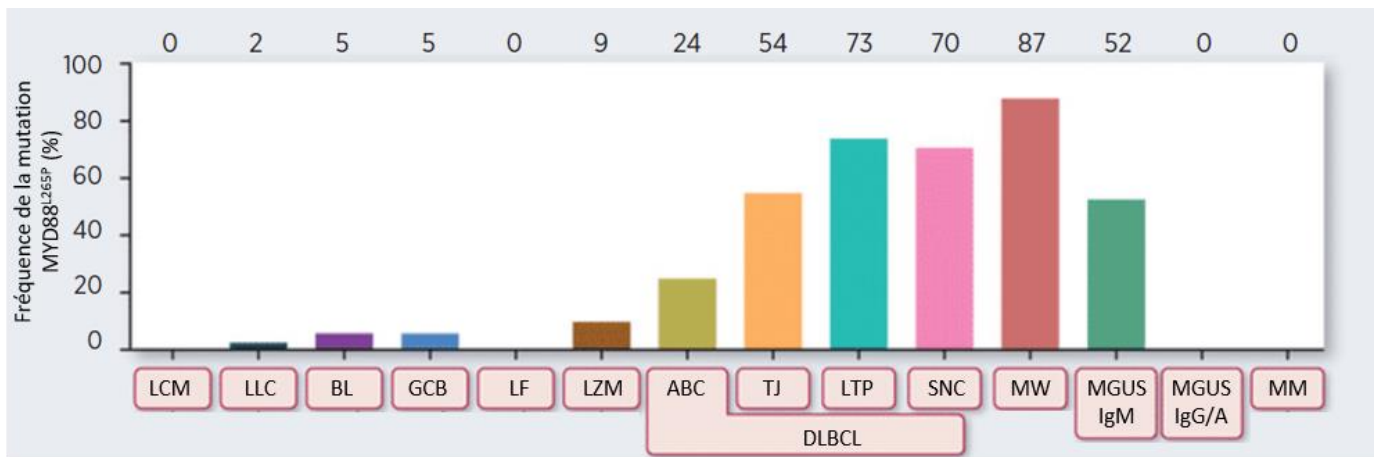


Figure 27 Diagramme de fréquence de la mutation MYD88^{L265P} dans les différents lymphomes B. LCM ; Leucémie lymphoïde chronique (LLC) ; BL ; DLBCL-GCB ; LF ; Lymphome de la zone marginale (LZM) ; DLBCL-ABC ; DLBCL cutané Type Jambe (TJ) ; Lymphome Testiculaire Primitif (LTP) ; DLBCL du Système Nerveux Central (SNC) ; MW ; MGUS IgM, IgG/A ; Myélome multiple (MM) (Figure adaptée de (X. Yu et al. 2018)).

La mutation MYD88^{L265P} est retrouvée dans 52% des patients avec un MGUS à IgM (X. Yu et al. 2018), une indication claire que la mutation est un évènement primaire dans la MW. Bien que très fortement associée à la mutation de MYD88, la MW est sans doute hétérogène au plan clinicobiologique. En effet, les patients peuvent présenter à des degrés variables des cytopénies périphériques, des neuropathies sensitives, une organomégalie et/ou une phase leucémique de leur lymphome. De plus, le degré de différenciation lymphoplasmocytaire est l'intensité du pic IgM est très variable. De fait, l'étude récente de D. Roos-Weil *et al.* chez 35 patients atteints par la MW et porteurs de la mutation MYD88^{L265P}, suggère que cette entité pourrait renvoyer à deux origines cellulaires différentes, le lymphocyte B mémoire (sous type MBC-like) ou le plasmocyte (sous type PC-like). Or le sous type MBC-like est plus volontiers associé à une splénomégalie et/ou à une thrombopénie. Le type MBC-like présente également une proportion plus élevée de petits lymphocytes mûrs (id.est le type PC-like présente un aspect lymphoplasmocytaire plus marqué) (Roos-Weil et al. 2020). Ceci indique que la mutation activatrice de MYD88 peut exercer son action oncogénique à différents stades de maturation de lymphocyte B. En effet, n'étant pas absolument spécifique de la MW, la mutation MYD88^{L265P} est aussi retrouvée dans 24% des DLBCL-ABC, 70% des lymphomes immunoblastiques primitifs du SNC, dans 54% des lymphomes B cutanés de type jambe et 73% des lymphomes testiculaires primitifs (X. Yu et al. 2018). Ces quatre types de lymphomes sont tous agressifs avec un phénotype activé et ont pour contrepartie tumorale supposée un lymphocyte B mémoire post centre germinatif. Plus précisément, l'origine cellulaire du lymphome B de type jambe se situe entre la cellule du CG et le plasmocyte ayant subi la SHM et exprimant l'IgM (Pham-Ledard et al. 2017). Les cellules à l'origine du lymphome du système nerveux central seraient aussi issues des cellules post-CG (aspect possiblement

plasmocytaire) et présentent un fort taux de mutations des régions VDJ dans le locus IgH (Camilleri-Broët et al. 2006; Bödör et al. 2020). Les lymphomes testiculaires primitifs aurait également pour origine les cellules B mémoires post-CG (avec aussi un fort taux de mutations dans les régions VDJ du locus IgH) avec un phénotype activé et un aspect plasmablastique (Cheah, Wirth, et Seymour 2014). Dans les DLBCL-ABC, l'expression caractéristique d'*IRF4* est le reflet moléculaire de l'engagement partiel des cellules tumorales dans la différenciation plasmocytaire telle que souvent vue au plan morphologique (Alizadeh et al. 2000). Ainsi il apparait que tous ces cancers B associés à la mutation activatrice de MYD88 seraient issus d'une cellule B mémoire IgM post-CG plus ou moins engagée dans la différenciation lymphoplasmocytaire. Dans une revue récente, Venturutti *et al.* proposent que le précurseur clonal de ces cancers B serait dans un état oscillant entre la cellule B mémoire post-CG et le préplasmocyte/plasmablaste (Venturutti et Melnick 2020). Dans ces LNH à cellules B activées, la mutation MYD88^{L265P} pourrait donc être un événement fondateur dans la transformation de la cellule B mémoire à IgM ayant subi la SHM et s'engageant par la suite dans la différenciation plasmocytaire. De ces lymphomes B associés à MYD88, la MW est la seule qui soit un lymphome indolent avec un contingent (souvent faible) de cellules B en différenciation plasmocytaire terminale (CD138+) responsable d'une sécrétion d'IgM monoclonale (Gayet et al. 2021). Nos résultats sur notre modèle murin indiquent clairement que MYD88 est capable de « pousser » la cellule B tumorale jusqu'au plasmocyte sécréteur d'IgM. Réciproquement, on peut se poser la question de savoir pourquoi MYD88 a « besoin » d'un contexte cellulaire lymphoplasmocytaire IgM pour exercer son pouvoir transformant (à l'opposé par exemple de *MYC* réarrangé dans le lymphome de Burkitt et dans le myélome, deux tumeurs issues d'un lymphocyte B à deux stades de maturation très distants, le lymphocyte B du CG et le plasmocyte commuté respectivement).

Ces résultats amènent à se questionner sur le rôle de MYD88^{L265P} dans l'émergence de ces lymphomes. La conséquence primaire étant l'activation constitutive du facteur de transcription NF- κ B, ce dernier permet l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans la survie et la prolifération (Ngo et al. 2011). Pour exemple, la signalisation autocrine provenant de la surexpression des cytokines inflammatoires IL6 et IL10 entraine ensuite une suractivation de la voie JAK/STAT3 dans les DLBCL-ABC (Lam et al. 2008). STAT3 entrainant la prolifération permet aussi l'inhibition de la voie des IFN de type I (IFN- α , IFN- β ...) via IRF7 (L. Lu et al. 2018). Dans les lignées cellulaires de DLBCL et MW, la surexpression de la protéine « hematopoietic cell kinase » (HCK) couplée à l'activation de cette dernière par IL6 entraine la prolifération et la survie participant ainsi à la néoplasie des cellules B dans ces pathologies (G. Yang et al. 2016). Il a aussi été démontré dans des cellules provenant de cas de MW, que

MYD88^{L265P} avait une affinité de liaison importante avec la « Bruton Tyrosine Kinase » (BTK) phosphorylée initialement connue dans la signalisation liée au BCR (Figure 28) (G. Yang et al. 2013)

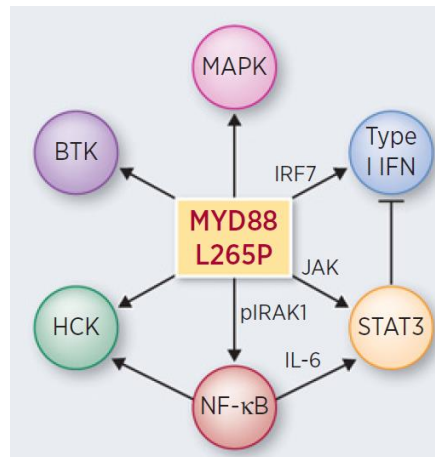


Figure 28 Représentation des conséquences fonctionnelles directes et indirectes de la mutation MYD88^{L265P} dans le cadre de la lymphomagénèse B. (Figure adaptée de (X. Yu et al. 2018)).

I.7. Le facteur de transcription NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est souvent suractivé dans des lymphomes B très divers (LF, LH, LCM, lymphome de la zone marginale splénique (LZMS), MALT, DLBCL-ABC, MW). De fréquentes altérations génétiques associées à ces différents LNHB ont pour conséquence l'activation constitutive de NF- κ B impliqué dans les voies de survie et de prolifération de la cellule. Beaucoup de travaux ont été réalisés sur ce thème pour mieux comprendre cette voie et développer des traitements pour ces maladies.

I.7.1. Le complexe NF- κ B

C'est en s'intéressant à la transcription de la chaîne légère κ en 1986 que Sen et Baltimore ont découvert dans des extraits de tumeurs à cellules B, un facteur de transcription appelé NF- κ B pour « Nuclear factor Kappa B » pouvant se lier à la séquence d'ADN « GGGACTTCC » du promoteur du gène IgL κ (Sen et Baltimore 1986a; 1986b) ; puis, plus tard, I κ B α , en opposition aux autres I κ B (décrites ci-après). En 1988, Baeuerle et Baltimore découvrent alors une forme inactivée de NF- κ B dans le cytoplasme ainsi que son inhibiteur nommé I κ B (Patrick A. Baeuerle et Baltimore 1988a; 1988b). Après plus de 30 années de recherche, il a été démontré que NF- κ B est exprimé dans quasiment tous les types de cellules et que ses sites de liaison à l'ADN (5'-GGGRNNNYCC-3') sont présents dans les promoteurs d'un large panel de gènes. Il a été rapidement démontré que ce facteur de transcription avait un rôle clé dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire, ainsi que dans la réponse à l'inflammation. Du fait de son impact dans de nombreux processus comme l'apoptose, la prolifération, la différenciation et le développement, NF- κ B est fortement régulé à de multiples niveaux. Le complexe d'I κ B kinase (IKK) permet la régulation des protéines I κ B qui inhibent directement NF- κ B en le retenant dans le cytoplasme (Oeckinghaus et Ghosh 2009; Mulero et al. 2019). De plus I κ B α fait partie des nombreux gènes régulés par NF- κ B. La transcription de son propre inhibiteur permet le rétrocontrôle négatif de NF- κ B en exportant le complexe du noyau au cytoplasme (Hayden et Ghosh 2008; 2014).

Chez les mammifères, la famille NF- κ B est composée de 5 sous-unités de protéines différentes (Figure 29A) :

- Rel-A (p65) (Chr11q13.1),
- RelB (Chr19q13.32),
- c-Rel (Chr2p16.1),
- p50 (issue du précurseur p105/NF κ B1) (Chr4q24),
- p52 (issue du précurseur p100/NF κ B2) (Chr10q24.32).

Elles partagent toutes la séquence conservée d'homologie REL (DHR) de 300 acides aminés. La partie N-terminale du DHR est nécessaire à la formation d'un homo- ou hétérodimère (Figure 29B). Cependant seules les protéines RelA, RelB et c-REL possèdent des domaines de transactivation (TAD) et RelB a besoin d'un domaine « leucine-zipper » (LZ) en plus pour être complètement active. C'est pourquoi lors de la dimérisation, le complexe NF- κ B est composé d'une sous-unité possédant au moins un DHR pour permettre la transcription des gènes cibles. Cependant les homodimères p50/p50 et p52/p52 n'ayant pas de domaine TAD, peuvent activer ou inhiber la transcription de certains gènes seulement en s'associant à certaines I κ B (BCL-3, I κ B ζ et I κ BNS) (Mitchell et Carmody 2018; Oeckinghaus et Ghosh 2009; Mulero et al. 2019).

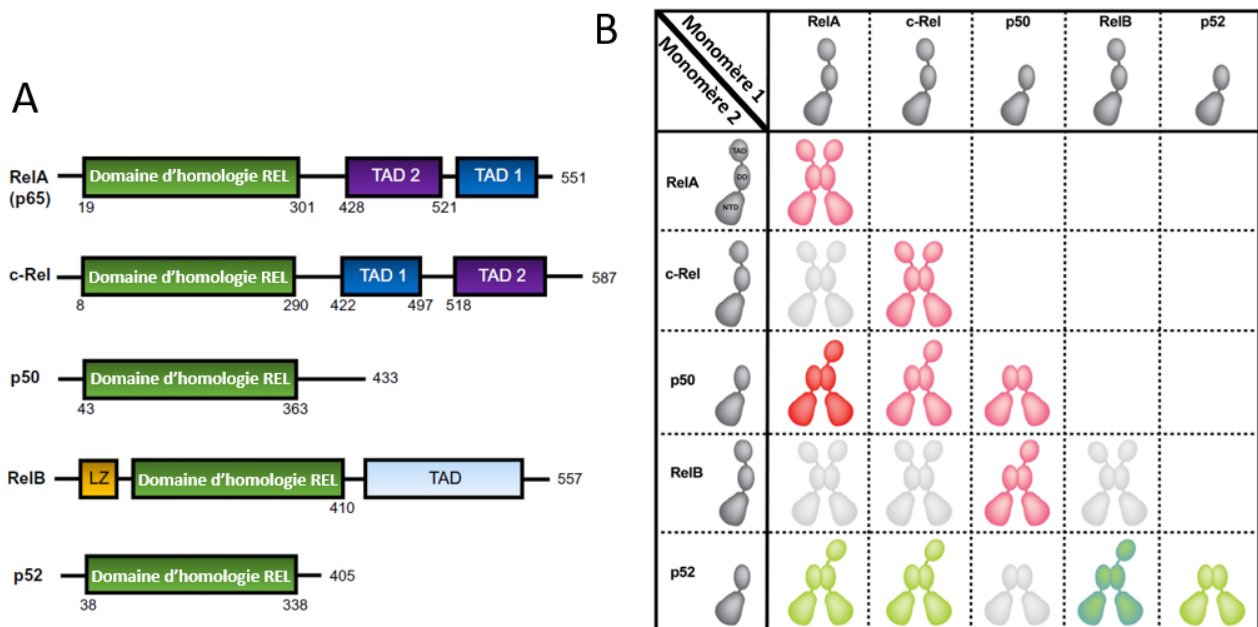


Figure 29 Représentation des sous-unités du complexe NF- κ B
A : Protéines de la famille NF- κ B (RelA (p65), c-Rel, p50, RelB, p52) avec leur domaine d'homologie REL, « leucine zipper » (LZ) et « transactivating domain » (TAD). Le nombre correspond à la quantité d'acides aminés. B : Dimères des protéines de la famille NF- κ B. Les dimères correspondant à la voie canonique de NF- κ B sont en rouge avec l'hétérodimère ubiquitaire p50/RelA en rouge foncé. Les dimères correspondant à la voie non-canonique (alternative) de NF- κ B sont en vert avec l'hétérodimère prédominant p52/RelB en vert foncé. En gris clair les dimères inexistantes. Domaine TAD (TAD), domaine de dimérisation (DD), domaine N-Terminal (NTD) (Figure adaptée de ((Mitchell et Carmody 2018; Mulero et al. 2019)).

La majorité des complexes NF- κ B des cellules non stimulées est retenue dans le cytoplasme par les protéines de la famille I κ B qui sont au nombre de 8 (Figure 30). Ce rôle est particulièrement attribué aux I κ B dites prototypiques (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) qui se lient aux dimères de NF- κ B en masquant la séquence d'adressage au noyau « nuclear localization signal » (NLS) présente dans le domaine de dimérisation (DD). La liaison se fait par le domaine de répétition ankyrine (ANK) de l'I κ B à la partie C-terminale du domaine DHR du complexe NF- κ B (Mitchell et Carmody 2018; Mulero et al. 2019). Les précurseurs de NF- κ B, p105 (I κ B γ) et p100 (I κ B δ), peuvent aussi inhiber la forme active de NF- κ B en se liant directement à un monomère par le DHR. (Rice, MacKichan, et Israël 1992; Naumann et al. 1993). Le domaine PEST en C terminal des I κ B α et I κ B β est appelé ainsi car il est riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), il permet d'empêcher la liaison d'NF- κ B à l'ADN (Sue et Dyson 2009; Dembinski et al. 2017). Contrairement aux I κ B prototypiques et aux précurseurs de NF- κ B, le rôle des I κ B atypiques (BCL-3, I κ B ζ , I κ BNS) est plus complexe et n'est pas encore totalement connu de nos jours. La structure de I κ B ζ et I κ BNS est similaire à celle de BCL-3. Elles sont localisées dans le noyau, et se lient avec les hétéro- ou homodimères de p50 ou p52 (Hoffmann, Natoli, et Ghosh 2006). Cependant I κ B ζ n'est exprimée que lors d'une stimulation via les récepteurs IL-1R et TLR4 (Yamazaki et al. 2005). BCL-3 peut permettre la transcription de certains gènes en éliminant les homodimères répressifs (p50/p50 et p52/p52) et laissant place à une forme active comme p65/p50 (Hayden et Ghosh 2004). A l'inverse, la surexpression de BCL-3 peut inhiber l'activation de NF- κ B (Wessells et al. 2004).

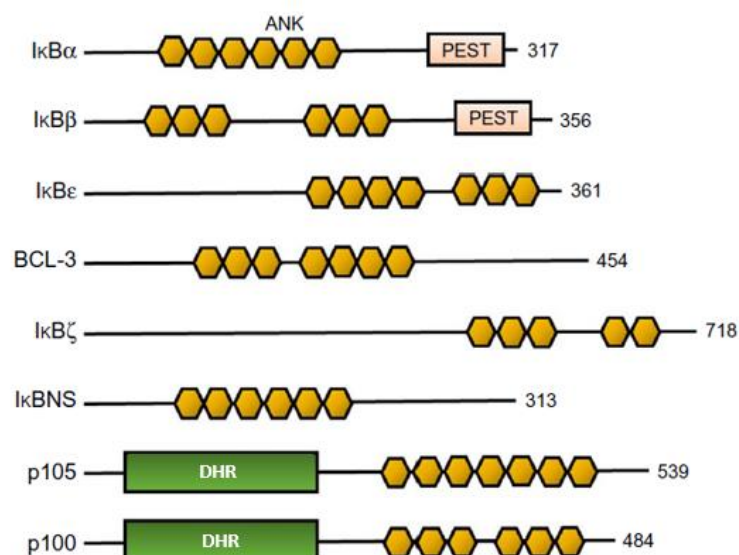


Figure 30 Représentation des inhibiteurs d'NF- κ B
 Protéines de la famille I κ B : membres prototypiques (classique) (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ), membres atypiques (BCL-3, I κ B ζ , I κ BNS) et précurseurs de NF- κ B (p105 et p100). Domaines d'homologie Rel (DHR), domaine de répétition ankyrine (ANK) et domaine PEST (PEST). Le nombre correspond à la quantité d'acides aminés (figure adaptée de (Mitchell et Carmody 2018)).

Lors de l'activation de NF- κ B par la voie dite classique ou canonique, les protéines I κ B sont phosphorylées par les I κ B kinase (IKK) du complexe IKK composé des protéines IKK α , IKK β et de la sous unité régulatrice IKK γ aussi appelée NEMO (Figure 31) (Israël 1997; Yamaoka et al. 1998). Les protéines IKK α et IKK β sont exprimées de façon ubiquitaire et sont composées d'un domaine kinase permettant la phosphorylation. Cette dernière est facilitée grâce au domaine « helix-loop-helix » HLH. Le domaine « leucine zipper » (LZ) permet la dimérisation des kinases, alors que le domaine « NEMO binding domain » (NBD) en C-terminal, entraîne la liaison au premier domaine « coiled coil » (CC1) de la protéine NEMO (Oeckinghaus et Ghosh 2009).

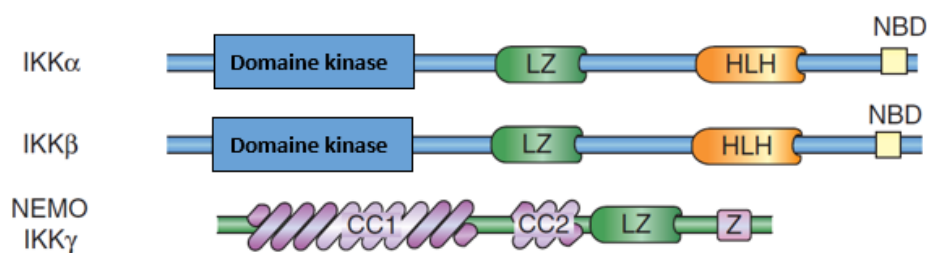


Figure 31 Représentation des I κ B kinases des voies NF- κ B
Protéines de la famille IKK : IKK α , IKK β , IKK γ (NEMO). Domaines « Leucine zipper » (LZ), « helix-loop-helix » (HLH), « NEMO binding domain » (NBD), « Coiled coil » (cc) et « zinc finger » (Z) (Figure adaptée de (Oeckinghaus et Ghosh 2009))

En 2001, l'équipe de Michael Karin a pu mettre en évidence la voie non canonique de NF- κ B dans les cellules B grâce au modèle murin *ikka*^{AA/AA}. Dans ce modèle l'inactivation de l'IKK α cause un blocage de la dégradation partiel de p100. La kinase IKK β , n'étant pas recrutée pour la dégradation de p100 induite par NIK, a donc mis en valeur une voie alternative de NF- κ B (Senftleben et al. 2001). Depuis, de nombreux récepteurs ont pu être associés à l'activation des voies canonique ou non canonique de NF- κ B (Figure 32).

En fonction du microenvironnement et des signaux perçus par les différents récepteurs de la cellule, la voie activatrice de NF- κ B peut être canonique (classique) ou non canonique (alternative). Dans ces deux voies, les complexes IKK phosphorylent les inhibiteurs I κ B et entraînent leur poly-ubiquitination (Ub) c'est-à-dire la liaison d'une chaîne protéique composée essentiellement d'ubiquitines reliées entre elle par la lysine (K) en position 48 (Ub-K48). Ceci est réalisé par une ubiquitine ligase E3. Ainsi l'Ub-K48 entraîne la dégradation par le protéasome de la protéine cible. Cette modification post-traductionnelle des inhibiteurs I κ B est nécessaire au passage de NF- κ B dans le noyau sous sa forme active. Le complexe se lie ensuite aux sites spécifiques de l'ADN et régule la transcription de gènes de survie, de prolifération et d'immunomodulation/inflammation (Figure 32) (Bonizzi et Karin 2004). La voie

non-canonique est liée aux complexes NF- κ B contenant RelB contrairement à la voie canonique où NF- κ B correspondant aux complexes RelA et cRel (Mulero et al. 2019). Notons à ce sujet que les rôles de RelA et cRel ne sont pas redondants, puisque cRel est essentiel à la survie des B du CG, et RelA est impliqué dans la différenciation plasmocytaire post-CG et régule l'expression de IRF4 entre autres gènes cibles (Heise et al. 2014).

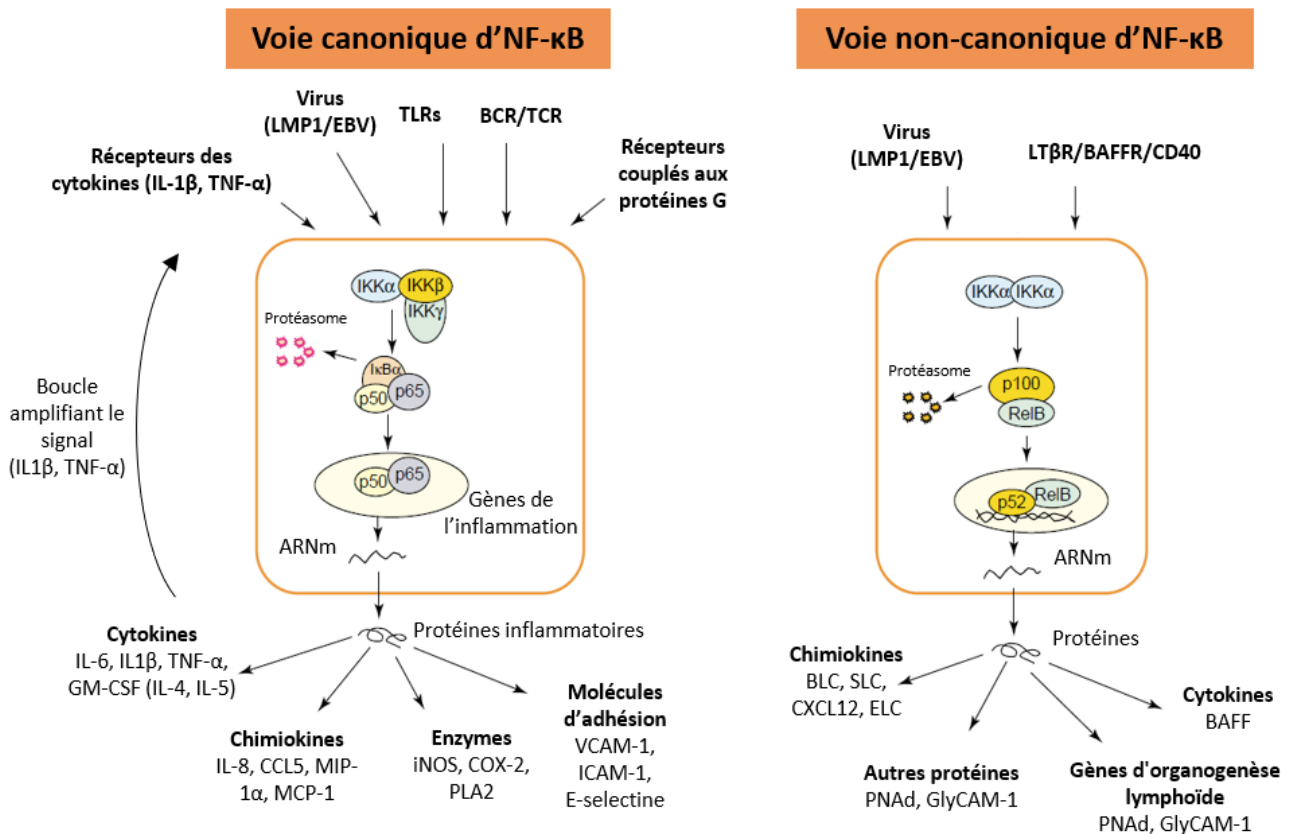


Figure 32 Schéma des différents récepteurs et plateforme IKK α , IKK β , NEMO, à l'origine de l'activation de la voie canonique ou non-canonique d'NF- κ B. Conséquences sur la production de protéines inflammatoires ou situationnelles (Figure adaptée de (Bonizzi et Karin 2004)).

I.7.2. Les récepteurs activant NF- κ B

I.7.2.1. Les récepteurs principalement associés à l'activation de la voie canonique de NF- κ B

I.7.2.1.1. TCR et BCR

La voie canonique de NF- κ B peut être activée via le BCR et le TCR par l'intermédiaire commun du complexe CBM composé de 3 protéines : « caspase recruitment domain family member 11 » (CARD11 ou CARMA1), « B cell CLL/lymphoma 10 » (BCL10) et « MALT1 Paracaspase » MALT1 (Figure 33) (H. Lu et al. 2018).

Du BCR à la phospholipase $Cy2$ (PLC γ 2)

Lorsque le BCR capte un Ag, cela modifie la configuration des chaînes Ig α (CD79A) et Ig β (CD79B) et entraîne la phosphorylation de leur motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM) par la tyrosine kinase de la famille SRC, LYN. Une autre tyrosine kinase, SYK, de la famille SYC, est ensuite recrutée puis phosphorylée. Un premier signalosome se forme alors avec les protéines « B cell linker protein » (BLNK), « Bruton tyrosine kinase » (BTK) aboutissant à la phosphorylation de PLC γ 2 (Figure 33) (Woyach, Johnson, et Byrd 2012).

Du TCR à la phospholipase $Cy1$ (PLC γ 1)

La présentation d'un peptide antigénique au TCR via le CMH entraîne la phosphorylation des motifs ITAM des chaînes ζ qui peuvent ensuite être phosphorylés par la tyrosine kinase de la famille SRC, LCK. La tyrosine kinase « zeta-chain-associated protein kinase » 70 (ZAP70) de la famille SYC est recrutée puis phosphorylée. Le signalosome formé par la suite est composé des protéines « SH2 domain containing leukocyte protein » de 76 kDa (SLP76), « linker of activated T cells » (LAT), « IL-2 inducible T cell kinase » (ITK) phosphorylant au final PLC γ 1 (Figure 33) (Huse 2009).

De la phospholipase C à NF-κB

Les phospholipases PLCγ1 ou PLCγ2 hydrolysent le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en diacylglycerol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). IP3 induit l'export de calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique au cytoplasme. Le DAG et l'IP3 permettent d'activer la protéine kinase C (PKC) (PKCθ dans les cellules T et PKCβ dans les cellules B) (Woyach, Johnson, et Byrd 2012; Huse 2009). La PKC vient ensuite phosphoryler 3 sérines dans le domaine inhibiteur de CARD11 qui change de configuration permettant l'accès aux sites de liaison à BCL10 qui est lié constitutivement à MALT1 (Qiao et al. 2013). Plusieurs dimères BCL10-MALT1 s'associent avec CARD11 formant des « filaments », aboutissant au recrutement de l'ubiquitine ligase « TNF receptor-associated factor 6 » (TRAF6) apte à catalyser la liaison d'une chaîne d'ubiquitines reliées entre elles par la lysine 63 (Ub-K63) de MALT1 et NEMO (David et al. 2018). En plus de l'Ub-K63, le complexe d'assemblage de chaîne d'ubiquitine linéaire (LUBAC), permet d'associer les chaînes linéaires d'ubiquitine liées par la méthionine 1 (Ub-M1) à NEMO. LUBAC est composé des 3 protéines, « heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1 » (HOIL1), « HOIL1-interacting protein » (HOIP) et « SHANK associated RH domain interacting protein » (SHARPIN) (Y. Yang et al. 2014). Ces deux types d'ubiquitination (Ub-K63 et Ub-M1) médient le recrutement via NEMO et l'activation optimale du complexe IKK (Gerlach et al. 2011). Plusieurs déubiquitinases comme TNFAIP3 (A20), la « CYLD Lysine 63 Deubiquitinase » (CYLD) et OTULIN peuvent inhiber ce recrutement (Q. Zhang, Lenardo, et Baltimore 2017). La protéine IKKβ est phosphorylée par la kinase « TGFβ-activated kinase 1 » (TAK1) couplée à ses protéines adaptatrices associées TAB2/3. IKKβ phosphoryle ensuite IKKα (Schuman et al. 2009). Le complexe IKK peut donc ensuite phosphoryler les sérines des IκB. IκBα est phosphorylée en S32 et S36, IκBβ en S19 et S23 et IκBε en S18 et S22 (Viatour et al. 2005). S'en suit l'Ub-K48 des IκB, signal de sa dégradation, permettant la libération de NF-κB pouvant alors passer dans le noyau (Figure 33) (Q. Zhang, Lenardo, et Baltimore 2017).

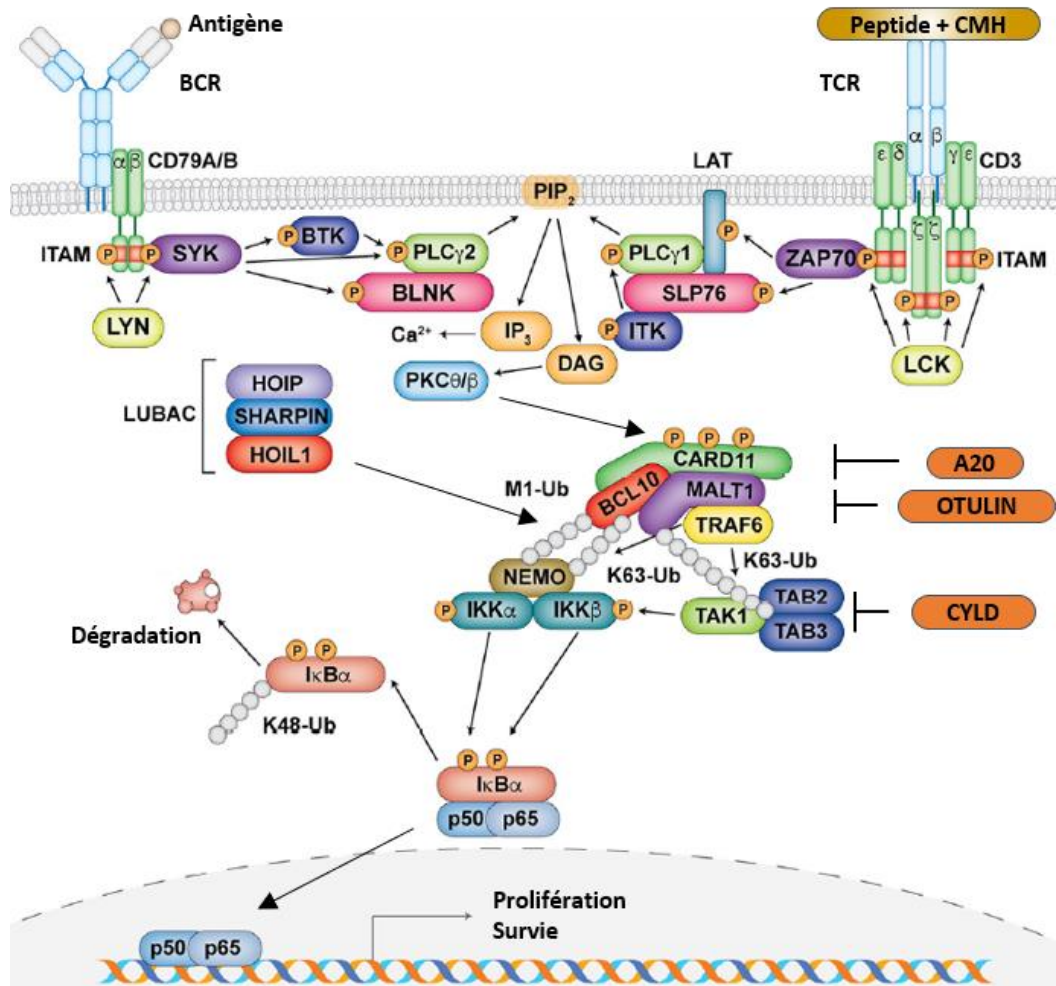


Figure 33 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec le BCR et le TCR (Figure adapté de (H. Lu et al. 2018)).

De plus, le BCR/TCR est en mesure d'activer NF-κB via la voie PI3K/AKT (Bresin et al. 2016), cette dernière étant détaillée dans la description des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

1.7.2.1.2. TLR et IL-1R

Après activation des TLR/IL-1R et recrutement de MYD88 ou TRIF et de ces protéines adaptatrices, IRAK4 est recrutée (Figure 24), il peut ensuite phosphoryler IRAK1 et 2 recrutant alors TRAF6. Cette ubiquitine ligase E3 sélectionne la protéine à modifier mais nécessite la présence du complexe E2 composé de « Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1 » (Uev1A) et de « Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2N (Homologous To Yeast UBC13) » (Ubc13) pour catalyser l'Ub-K63 de NEMO (Deng et al. 2000). L'Ub-M1 médiée par LUBAC et la

phosphorylation par le complexe TAK1-TAB permet l'activation du complexe IKK α / β (C. Wang et al. 2001). Ceci entraîne la phosphorylation des sérines S32 et S36 d'IkB α libérant NF- κ B (Dhillon et al. 2019).

Les protéines TRAF ne sont pas forcément toutes activatrices de la voie NF- κ B. TRAF3 inhibe le complexe TRAF6/TAB/TAK1. Cependant TRAF6 catalyse aussi l'Ub-K63 de cIAP1/2 autrement appelé « Baculoviral IAP Repeat Containing » 2 et 3 (BIRC2/3) ce qui active la fonction d'ubiquitine ligase E3 de cIAP1/2 et permet l'Ub-K48 la protéine TRAF3 avec pour conséquence sa dégradation par le protéasome (Figure 34) (Ostuni, Zanoni, et Granucci 2010). Le rôle de TRAF1 a été longuement remis en cause car il est capable d'agir comme un régulateur positif ou négatif de la voie NF- κ B s'il est surexprimé (Edilova, Abdul-Sater, et Watts 2018). Dans le cadre de l'activation du TLR, il agit comme un régulateur négatif en interférant avec le complexe LUBAC, inhibant l'activation de NF- κ B (Abdul-Sater et al. 2017).

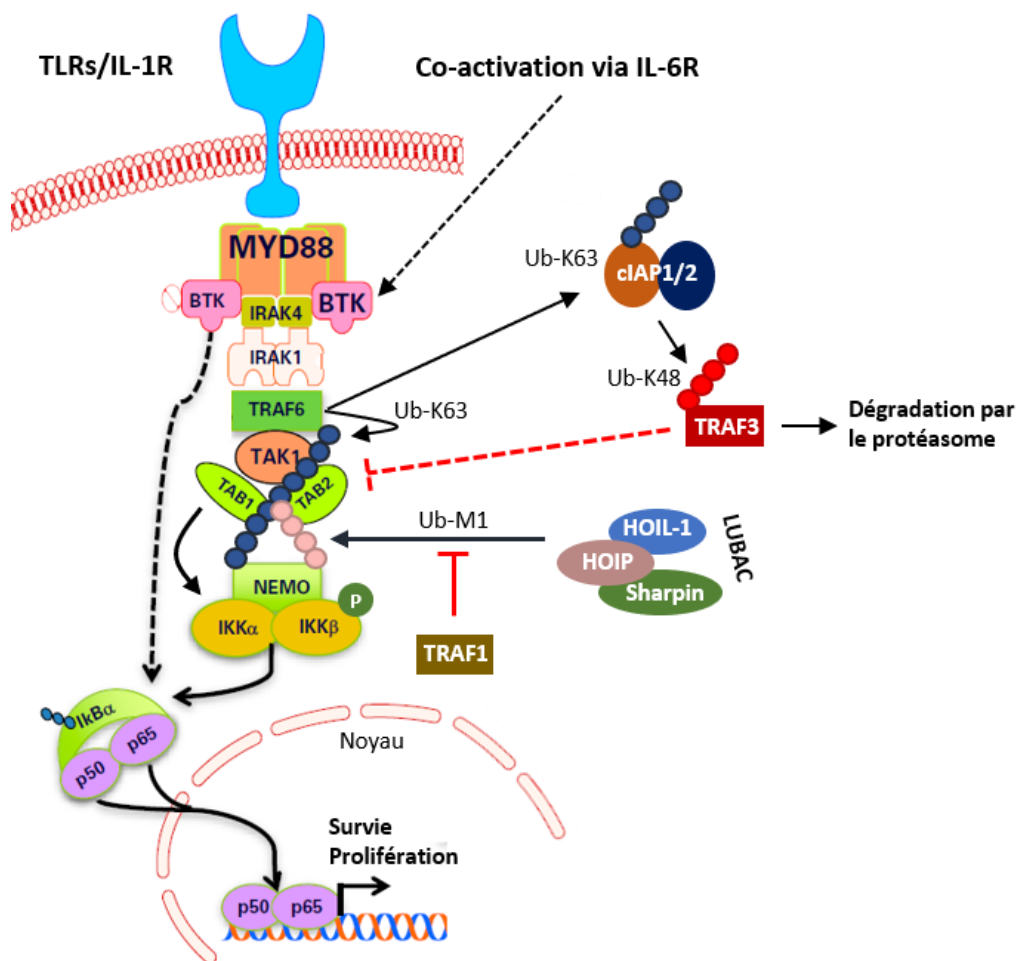


Figure 34 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF- κ B en lien avec les récepteurs TLR/IL-1R. (Figure adaptée de (Hunter et al. 2017; Dhillon et al. 2019)).

Lors de l'activation d'un TLR, la voie canonique de NF- κ B est activée via les protéines IRAK et TRAF. Cependant, depuis 2003 nous savons que dans certains cas, la protéine BTK pouvant être co-activée par la signalisation IL-6R (Hunter et al. 2017), peut se lier aux domaines TIR et participe à l'activation de NF- κ B (Jefferies et al. 2003; K.-G. Lee et al. 2012).

Le rétrocontrôle de la voie des TLRs via l'inhibition de TRAF6 est assuré par plusieurs déubiquitinases A20, CYLD, Otud7b, USP2a, USP4, USP20 et MYSM1 (Harhaj et Dixit 2011; Shi et Sun 2018).

I.7.2.1.3. TNFR1

Les récepteurs de la superfamille des « Tumor necrosis factor receptor » (TNFRSF) ont pour ligand les TNFs. Ils ont un rôle important dans la régulation des voies NF- κ B, « Jun kinase » (JNK) et la voie des caspases. Ces voies entraînent la réponse pro-inflammatoire, la différenciation cellulaire ou la mort cellulaire. Les récepteurs TNFR1 (TNFRSF1A) et 2 (TNFRSF1B) se lient aux mêmes ligands mais les domaines intracellulaires sont différents. La partie cytoplasmique de TNFR1 contient un site appelé « death domain » (DD), qui lui permet de recruter « TNFR1-associated death domain protein » (TRADD) et qui se lie à la protéine « receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 » (RIPK1 ou RIP1) et à TRAF2 ou encore TRAF5 qui aurait des fonctions similaires à TRAF2. Ce dernier étant en mesure de se complexer à TRAF1, ils forment ainsi le complexe TRAF1/2 qui peut recruter cIAP1/2. Le récepteur TNFR2, ne possédant pas de domaine DD se lie directement à TRAF1/2 et cIAP1/2. Ceci amène à supposer que TNFR2 pourrait atténuer l'activation de TNFR1 par compétition (Lavrik 2005; Brenner, Blaser, et Mak 2015). Dans le cas de l'activation des TNFRs, TRAF1 a un rôle activateur (contrairement à son rôle lors de l'activation des TLRs) car le dimère TRAF1/2 permet de faire la jonction entre cIAP1/2 et TRAF3, limitant l'effet inhibiteur de ce dernier (Tang, Zhang, et Wei 2018). Le complexe cIAP1/2, grâce à sa fonction de ligase E3, et à Ubc13/Uev1a (E2), réalise l'Ub-K63 de RIPK1 et LUBAC l'Ub-M1. Le complexe TAK1-TAB peut donc être recruté et activé le complexe IKK, lui-même lié à RIPK1 grâce à l'Ub-M1 médié par LUBAC. I κ B est donc phosphorylé et subit une Ub-K48 puis est dégradé, libérant NF- κ B (Figure 35) (Edilova, Abdul-Sater, et Watts 2018).

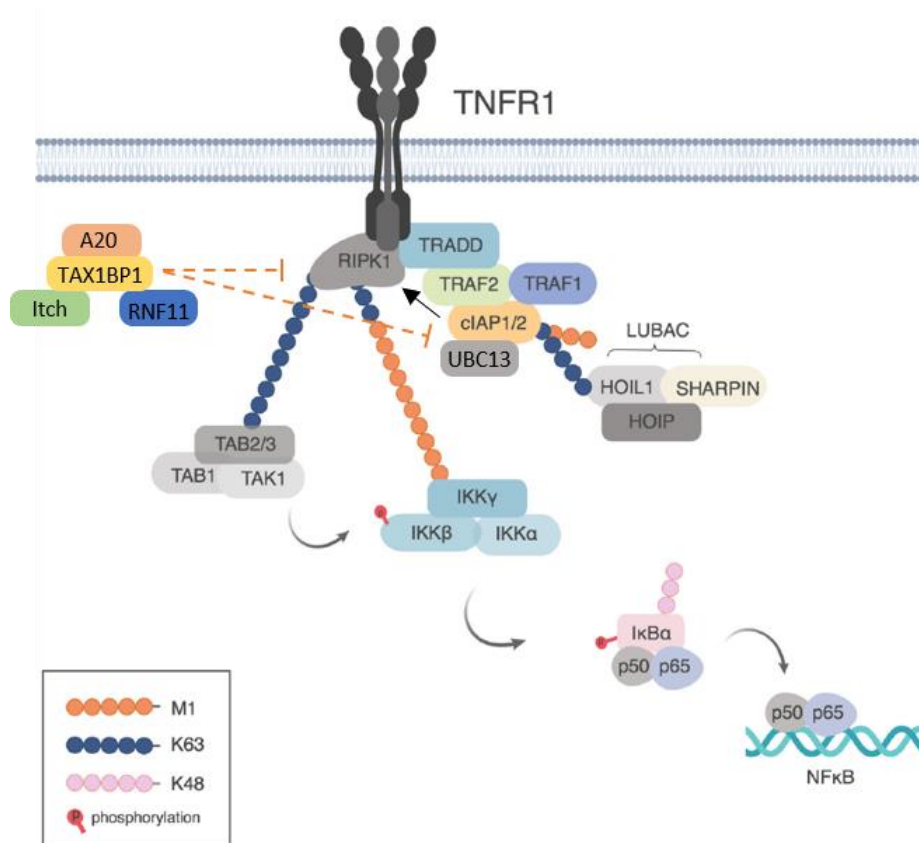


Figure 35 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF-κB en lien avec le récepteur TNFR. (Figure adaptée de (Edilova, Abdul-Sater, et Watts 2018)).

A20 complexé à « Tax1 binding protein 1 » (TAX1BP1), « Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase » (Itch), « Ring Finger Protein 11 » (RNF11) peut entraîner l'Ub-K47 de Ubc13, ainsi que le remplacement de l'Ub-K63 par une Ub-K47 de RIPK1 permettant la dégradation de ces protéines et ainsi le rétrocontrôle de l'activation NF-κB par TNFR1 (Figure 35) (Harhaj et Dixit 2011).

1.7.2.1.4. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont une grande famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires nécessitant la protéine G pour transmettre le signal. Les ligands sont nombreux, de type chimique, hormonal, peptidique et autres (Hilger, Masureel, et Kobilka 2018). Lorsqu'un ligand se lie au RCPG, cela entraîne la dissociation de l'hétérotrimère composant la protéine G ($G\alpha GDP\beta\gamma$) séparant alors la protéine $G\alpha GTP$ du dimère $G\beta\gamma$. Ces dernières peuvent toutes deux activer des voies de signalisation à l'aide de différents

effecteurs (Senarath et al. 2018). Le dimère Gβγ peut donc activer la voie NF-κB de deux manières. La première, plus connue, se fait par le biais de l'activation de BTK, BLNK puis PLCγ2, qui catalyse la formation de DAG, IP3 et Ca²⁺ à partir de PIP2. DAG et Ca²⁺ active ensuite la PRKCβ qui phosphoryle CARMA1 pour former le complexe BCM entraînant l'activation de la voie canonique de NF-κB (Krysiak et al. 2017). La deuxième option d'activation d'NF-κB via l'axe PI3K/AKT par les RCPG étant peu étudiée, la voie canonique ou non-canonique liée à ces récepteurs n'a pas encore été clairement mise en valeur. Le dimère Gβγ est apte à recruter PI3Kγ qui va phosphoryler PIP2 en PIP3, avec pour antagoniste « Phosphatase And Tensin Homolog » (PTEN). PIP3 permet de faire le lien entre les protéines AKT et PDK1 permettant à cette dernière de phosphoryler AKT. Une fois activé AKT phosphoryle IKKα (Agarwal et al. 2005; Kucuksayan H et Akgun S 2016). L'activation de NF-κB est liée à l'activation de RelA(p65) (Figure 36) (Madrid et al. 2000).

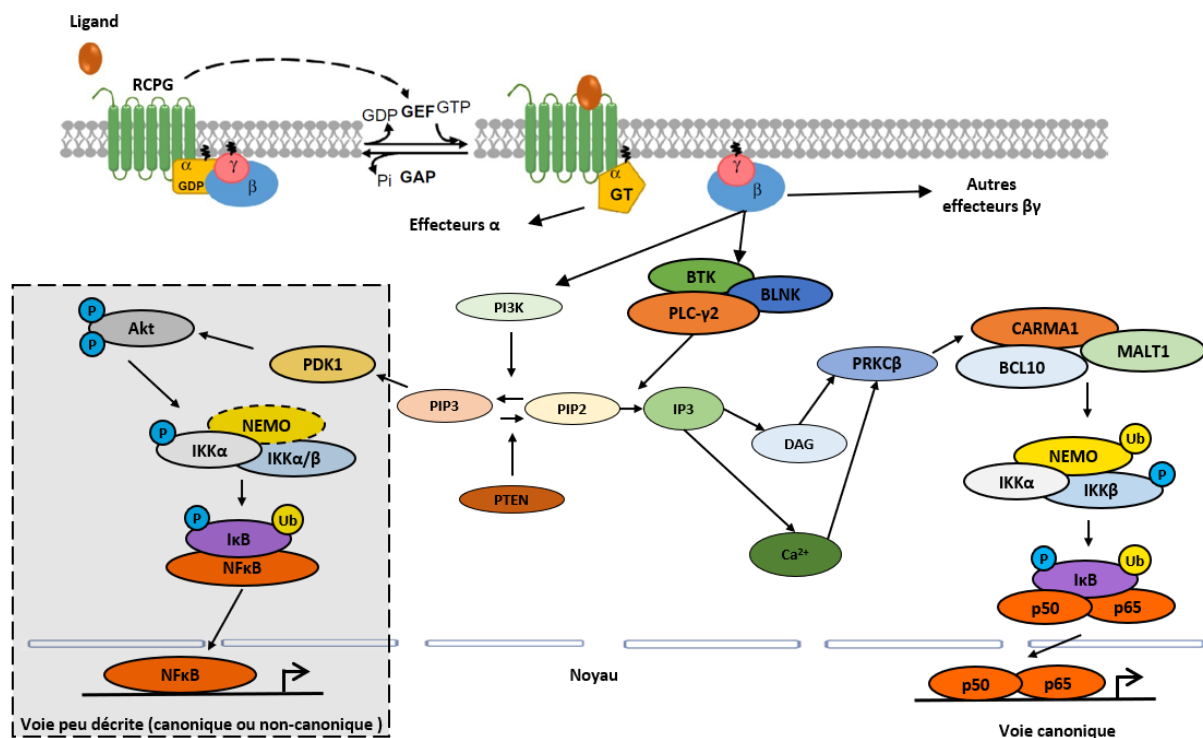


Figure 36 Schéma de la voie de signalisation des RCPG. Activation NF-κB via PI3K/Akt ou empruntant la voie canonique de NF-κB via le complexe BCM (Figure adaptée de (Senarath et al. 2018; Kucuksayan H et Akgun S 2016; Agarwal et al. 2005; Krysiak et al. 2017)).

Les RCPG sont le plus souvent retrouvés impliqués dans des tumeurs solides, cependant certaines mutations retrouvées fréquemment dans les lymphomes B peuvent aussi impacter ces récepteurs comme CXCR4 retrouvé muté dans 30 à 40% des MW (Hunter et al. 2014; Poulain et al. 2016).

I.7.2.1.5. LMP1

Le dimère (ou trimère) TRAF1/2 se fixant sur la région cytoplasmique « transformation effector site 1 » (TES1) de LMP1 qui est une protéine de la latence 2 et 3 de l'Epstein Barr Virus (EBV), peut contribuer à l'activation de la voie canonique de NF- κ B sans l'intervention de cIAP1/2. TES1 engendre l'Ub-K63 de TRAF2, TRAF1 devient ensuite le substrat de LUBAC pour l'Ub-M1 permettant possiblement d'activer le complexe IKK. Le domaine TES2 de LMP1 recrute TRADD puis TRAF6 qui réalise l'Ub-K63 permettant d'attirer LUBAC qui fixe une chaîne d'Ub-M1 sur NEMO. Le signalosome de LMP1 possédant des chaînes Ub-K63 recrute le complexe TAK1-TAB activant le complexe IKK. Ce dernier phosphoryle I κ B α entraînant l'Ub-K48 ainsi que sa dégradation, ayant pour conséquence d'activer NF- κ B (Figure 37) (L. W. Wang, Jiang, et Gewurz 2017).

Même si l'activation de la voie non canonique a pu être rapportée, LMP1 active essentiellement la voie canonique (Chanut et al. 2014). Nous savons que la région TES1 peut aussi recruter le dimère TRAF3/5, puis au même titre que CD40, il recrute le complexe cIAP1/2 empêchant la dégradation de NIK ayant pour conséquence d'activer la voie non canonique de NF- κ B (Figure 37) (L. W. Wang, Jiang, et Gewurz 2017).

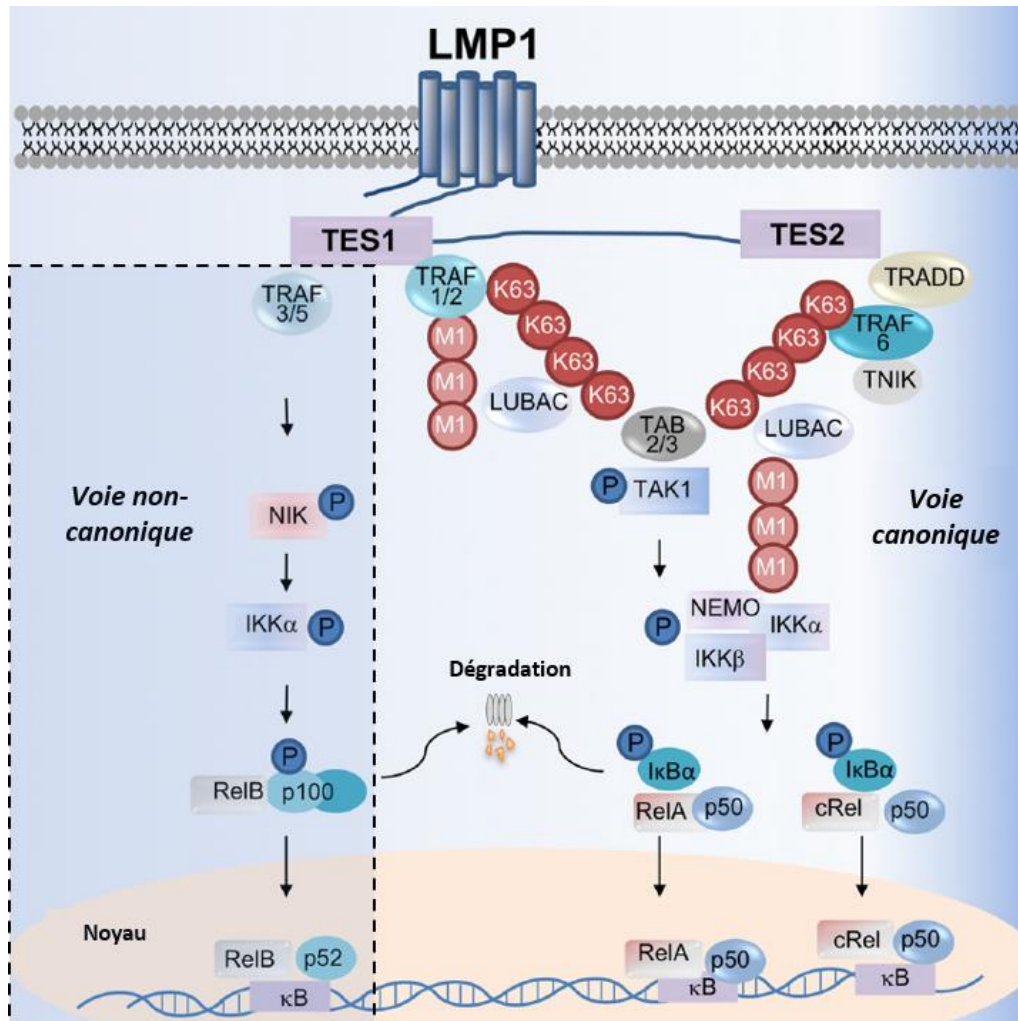


Figure 37 Schéma de la voie de signalisation canonique ou non canonique de NF-κB en lien avec la protéine LMP1 de l'EBV.
(Figure adaptée de (L. W. Wang, Jiang, et Gewurz 2017)).

I.7.2.1.6. EDAR, XEDAR

D'autres récepteurs de la superfamille des TNFR pouvant activer NF-κB sont connus pour leur implication dans la dysplasie ectodermique (maladie génétique du développement de l'ectoderme). Le récepteur « Ectodysplasin A Receptor » (EDAR) a pour ligand « Ectodysplasin A1 » (EDA-A1) et recrute la protéine « EDAR Associated Death Domain » (EDARADD) puis TRAF6 permettant d'emprunter la voie canonique de NF-κB. Le récepteur « X-Linked Ectodysplasin-A2 Receptor » (XEDAR/TNFRSF27) ayant pour ligand EDA-A2, recrute directement le complexe TRAF3/6 pouvant activer la voie canonique de NF-κB via l'interaction avec TAK1/TAB, ou la voie non canonique en empêchant l'inhibition de NIK (Mikkola et Thesleff 2003).

I.7.2.1.7. CD30

Le récepteur CD30 (TNFRSF8) est exprimé chez les lymphocytes B activées et a pour ligand CD30L (TNFSF8). Ce récepteur peut se lier à TRAF1, 2 et 5 pour activer la voie classique de NF- κ B (Figure 38) (van der Weyden et al. 2017)

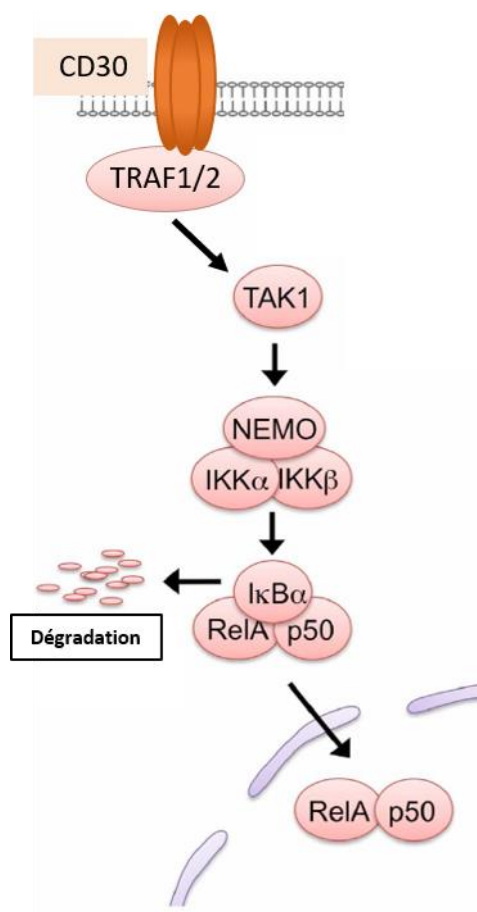


Figure 38 Schéma de la voie de signalisation canonique de NF- κ B en lien avec le récepteur CD30. (Figure adaptée de (Akiyama, Shinzawa, et Akiyama 2012; Rickert, Jellusova, et Miletic 2011)).

I.7.2.2. Les récepteurs principalement associés à l'activation de la voie non canonique de NF- κ B

I.7.2.2.1. CD40, RANK, BCMA, TACI et Fn14

Le récepteur CD40 (TNFRSF5) est connu des lymphocytes B et des autres CPA. Lorsque le ligand CD40L exprimé par les cellules T se lie à son récepteur CD40, cela entraîne l'initiation de la réponse adaptative cellulaire et humorale (Elgueta et al. 2009). A la surface des CPA,

l'activation de CD40 entraîne la production de cytokines, induit l'expression de molécules stimulatrices à la surface et facilite la présentation de l'Ag (Quezada et al. 2004). Chez les cellules B, la signalisation CD40 permet la formation du centre germinatif, l'hypermutation somatique, la commutation de classe et la formation de plasmocytes à longue durée de vie (Danese, Sans, et Fiocchi 2004). Lorsque CD40L se lie à CD40, ce dernier peut recruter via son domaine cytoplasmique différentes protéines TRAFs activant les voies canonique et non canonique de NF- κ B (Figure 39), mais aussi la voie des MAP kinases ainsi que la voie PI3K/AKT. CD40 peut aussi recruter la kinase 3 de la famille des Janus kinases (JAK3) ayant un rôle dans la survie cellulaire (Bishop et al. 2007; Säemann et al. 2002).

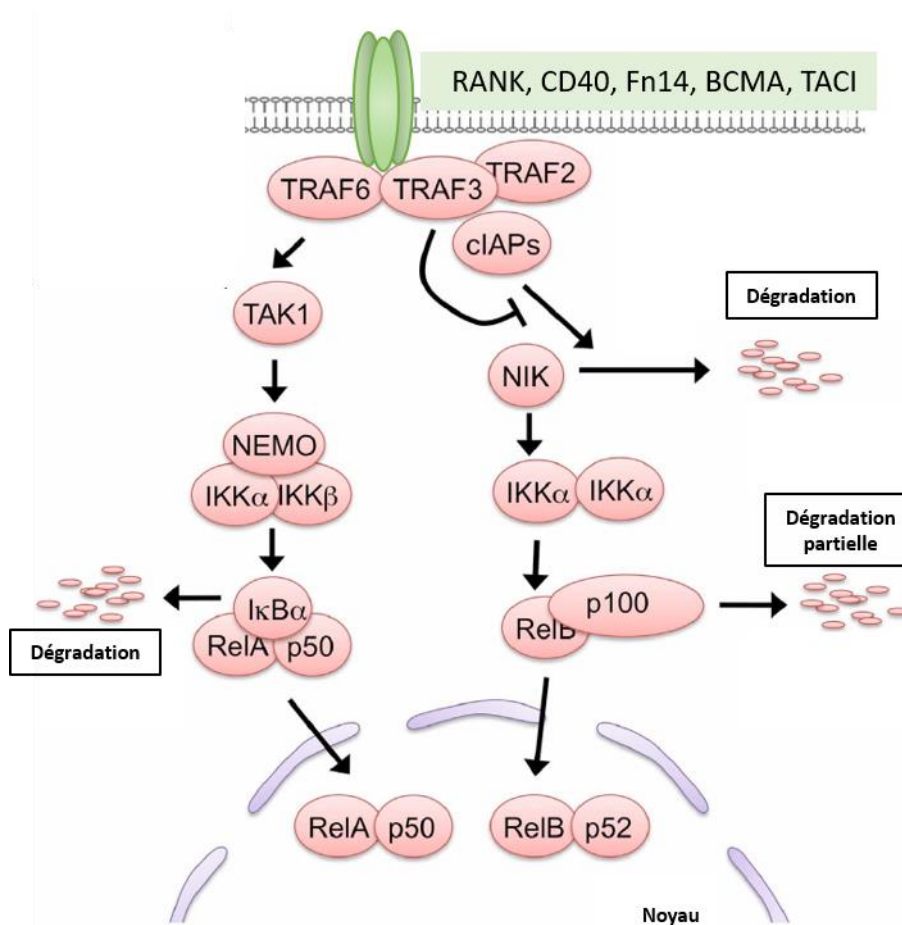


Figure 39 Schéma de la voie de signalisation canonique et non canonique de NF- κ B en lien avec les récepteurs RANK, CD40, BCMA, TACI et Fn14. (Figure adaptée de (Akiyama, Shinzawa, et Akiyama 2012; Rickert, Jellusova, et Miletic 2011)).

Le récepteur RANK (TNFRSF11a) est connu pour avoir un rôle essentiel dans l'homéostasie des os mais aussi dans le développement des ganglions. Lorsqu'il se lie à son ligand « osteoprotegerin ligand » (OPGL) aussi appelé TRANCE, RANKL ou ODF, il peut

recruter les protéines TRAF1, 2, 3, 5 et 6 et activer les voies NF- κ B (Figure 39) (Kong et al. 1999; D. Kim et al. 2000; Akiyama, Shinzawa, et Akiyama 2012).

Le récepteur TNF « fibroblast growth factor inducible 14 » (Fn14, TNFRSF12a, TweakR) a pour ligand « TNF-Related WEAK Inducer Of Apoptosis » (TWEAK). Il est normalement faiblement exprimé dans les tissus sains mais surexprimé dans certaines tumeurs solides comme les glioblastomes (Perez et al. 2016). Fn14 peut activer la voie canonique ou non canonique de NF- κ B ainsi que les voies des MAP kinases via le recrutement de protéines TRAFs (Figure 39). Comme les récepteurs CD40 et RANK, Fn14 influence donc les processus de l'apoptose, la prolifération, la différenciation et le développement (Shuichi Sato, Ogura, et Kumar 2014).

Les récepteurs « B Cell Maturation Antigen » BCMA (TNFRSF17) et « Transmembrane Activator And CAML Interactor » TACI (TNFRSF13B) ont pour ligand « A Proliferation-Inducing Ligand » APRIL (TNFSF13) et BAFF. BCMA est exprimé au niveau des cellules B du CG, des cellules B mémoires (chez l'humain) et des plasmocytes et entraîne la survie de ces derniers. TACI est exprimé dans les cellules B matures et les plasmocytes. Comme CD40, BAFFR et BCMA, le récepteur TACI se lie aux TRAFs mais il peut aussi recruter MYD88 et IRAK4. BCMA et TACI peuvent activer la voie classique et alternative de NF- κ B (Figure 39) (Rickert, Jellusova, et Miletic 2011).

I.7.2.2.2. LT β R et BAFFR

Le récepteur « Lymphotoxin Beta Receptor » (LT β R / TNFRSF3) a pour ligand les protéines « Lymphotoxin Alpha » (LTA / TNFSF1), « Lymphotoxin Beta » (LTB / TNFSF3) et « Herpesvirus Entry Mediator Ligand » (HVEM / LIGHT / TNFSF14). Le récepteur « B cell-activating factor receptor » (BAFFR / TNFRSF13C) est activé par le ligand « B cell-activating factor » (BAFF / TNFSF13B). Faisant tous deux partie de la superfamille des TNFR, BAFFR est connu pour améliorer la survie des cellules B et LT β R joue un rôle important dans le développement des organes lymphoïdes (Cildir, Low, et Tergaonkar 2016).

A l'état basal dans la cellule, « NF- κ B-inducing kinase » (NIK) est régulé négativement par le complexe ubiquitine ligase TRAF2/3-cIAP1/2. NIK subit une Ub-K48, ce qui l'adresse au protéasome pour sa dégradation. Lorsque les récepteurs LT β R et BAFFR se lient à leur ligand,

ils recrutent le complexe TRAF2/3-ciAP1/2 empêchant ainsi l'Ub-47 de NIK mais entraînant celle de TRAF3. La protéine NIK n'est donc plus attirée au complexe ubiquitine ligase par TRAF3 et peut phosphoryler les sérines 866 et 870 du dimère IKK α entraînant à leur tour la phosphorylation des sérines 99, 108, 115, 123 et 872 de p100. Le précurseur p100 subit alors l'Ub-K48 qui entraîne une dégradation partielle par le protéasome et donne naissance à la sous unité p52 faisant partie du complexe NF- κ B lié à la voie non canonique (Figure 40) (Xiao, Fong, et Sun 2004; Cildir, Low, et Tergaonkar 2016).

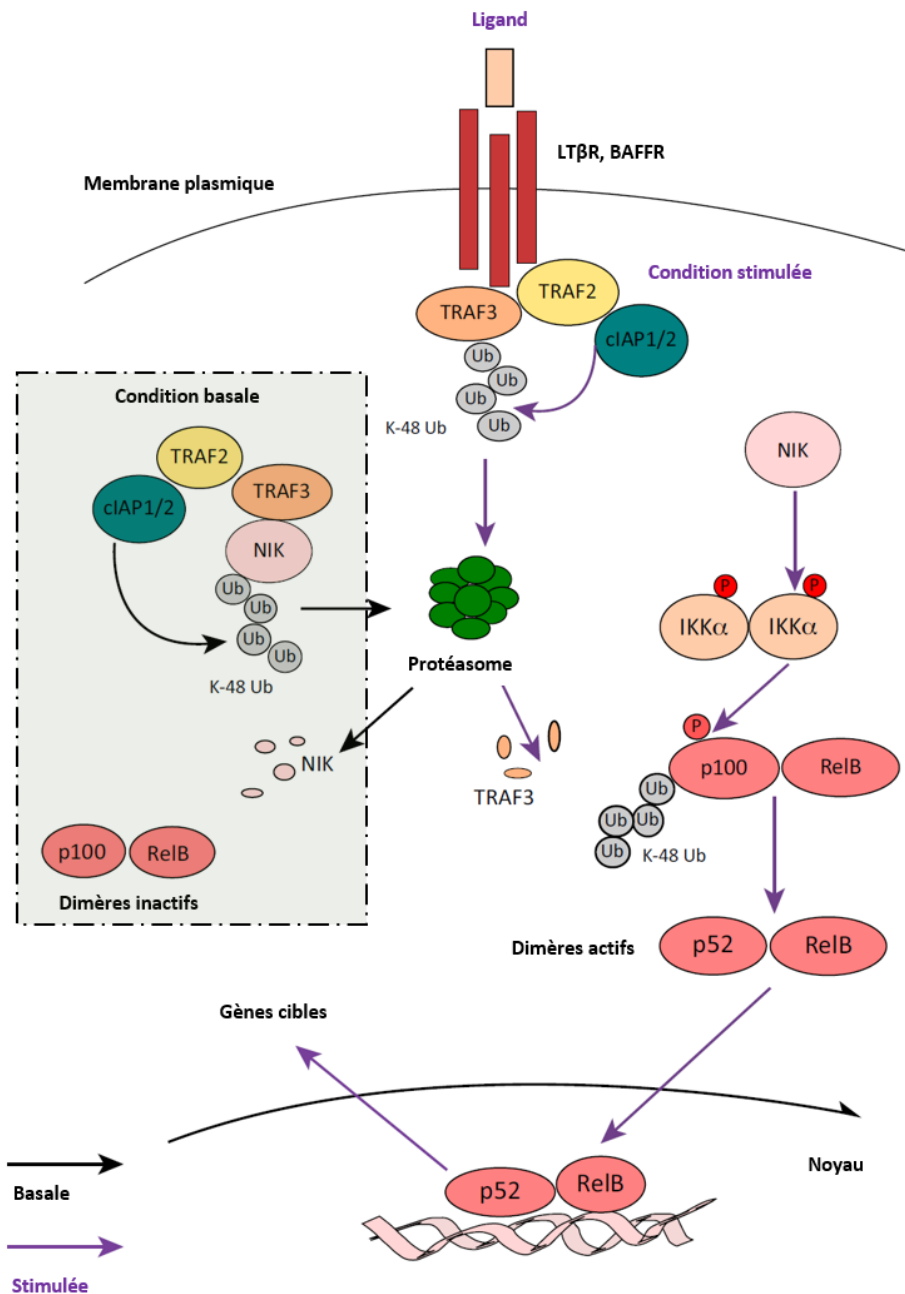


Figure 40 Schéma de la voie de signalisation canonique et non canonique de NF- κ B en lien avec les récepteurs LT β R et BAFFR. (Figure adaptée de (Cildir, Low, et Tergaonkar 2016)).

La liaison de BAFFR à son ligand peut aussi permettre l'activation de la voie canonique par le biais de BTK (Shinners et al. 2007). De même pour LT β R, l'activation de NIK pouvant interagir avec TAK1 lui octroie la possibilité d'activer la voie canonique de NF- κ B (Shim et al. 2005; Giaccone et Soria 2013).

Au total, la voie non canonique apparait comme indispensable à la différenciation plasmocytaire terminale et à la survie du plasmocyte de longue durée de vie.

I.7.3. Les modèles murins permettant l'étude des protéines des voies NF-κB

Beaucoup de gènes impliqués dans la voie classique et alternative de NF-κB sont retrouvés fréquemment mutés, délétés ou amplifiés dans les lymphomes B. Ceux-ci ont pour conséquence la suractivation du facteur de transcription NF-κB, révélant son importance cruciale dans l'émergence de ces cancers. Ces voies ont donc été grandement étudiées ces dernières décennies au travers d'expérimentations *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. L'importance de l'expérimentation *in vivo* est telle que certains aspects de ces maladies ont pu être mis en valeur chez l'humain par la suite. Le modèle animal le plus utilisé à l'étude des lymphomes est le modèle murin. 80% des gènes de la souris sont orthologues à ceux de l'humain (Lamprecht Tratar, Horvat, et Cemazar 2018). La souris a la capacité de se reproduire rapidement, et à un coût relativement faible à l'élevage. Mais la raison la plus évidente est sa résistance à la consanguinité, permettant ainsi à son génome d'être exempt de toutes mutations germinales aléatoires dues au « crossing over » lors de la méiose. Cette caractéristique permet d'observer les conséquences dues aux seules modifications apportées par l'humain dans les modèles de souris transgéniques.

L'expérimentation *in vitro* est un bon moyen d'étudier l'impact d'une protéine sur la ou les voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée. L'expérimentation *in vivo* quant à elle, permet l'étude de la signalisation cellulaire dans des conditions plus proches de celles de l'humain (autrement dit au sein d'un organisme entier), et permet aussi de comprendre l'impact qu'elle subit par le microenvironnement ou qu'elle peut avoir sur ce dernier. C'est pourquoi un moyen efficace de comprendre le fonctionnement d'une protéine est de surexprimer ou de supprimer l'expression du gène concerné dans tout l'organisme ou un type cellulaire en particulier (Lamprecht Tratar, Horvat, et Cemazar 2018).

L'invalidation d'un gène de façon ubiquitaire est intéressante dans un premier temps pour l'étude du rôle d'un facteur dans le développement d'un organisme. Cependant l'invalidation des gènes de façon ubiquitaire peut être létale pour l'embryon. De plus, cela limite l'interprétation du rôle de la protéine dans un type cellulaire en particulier (comme les cellules B) car les cellules du microenvironnement sont aussi impactées.

C'est pourquoi il a été pensé de nouveaux types de modèles pour l'invalidation d'un gène dans un type cellulaire particulier. Avant les années 90, l'équipe de Harris *et al.*, décrit pour la

première fois le modèle murin *Eμ-Myc*. C'est un modèle d'expression du transgène exclusivement dans les cellules B, le promoteur *Eμ* du Locus IgH, permettant de surcroît une expression constitutive du gène en question (Harris et al. 1988)

C'est aussi le cas des modèles chimériques *Rag2^{-/-}* (Shinkai et al. 1992). Le développement des cellules B du modèle *Rag2^{-/-}* est bloqué au stade Pro-B. Dans ces modèles, les cellules souches embryonnaires (ES) avec un gène d'intérêt invalidé sont injectées dans un blastocyste *Rag2^{-/-}*. Si les cellules B d'une des chimères passent le stade Pro-B alors les cellules ES permettant le développement B sont issues des ES injectées (J. Chen et al. 1993).

D'autres modèles ont été créés invalidant des gènes de façon conditionnelle. Cela étant rendu possible grâce à l'expression d'une enzyme bactérienne, la Cre-recombinase (Cre). Cette dernière peut être produite dans un type cellulaire donné grâce au choix du promoteur avec lequel le gène de cette enzyme est exprimé. Cette enzyme étant capable de recombiner des séquences spécifiques appelées LoxP, elle peut donc permettre la suppression d'un ou plusieurs exons floxés (flanqués par ces motifs LoxP) (Kuhn et al. 1995).

La voie NF-κB fait l'objet de très nombreuses études depuis la découverte de ce facteur de transcription en 1986 (Sen et Baltimore 1986a). A ce jour, plus de 130 modèles murins transgéniques ont pu être répertoriés avec un impact sur la voie NF-κB. Dans un premier temps nous proposons une rétrospective des modèles ayant permis de d'étudier les protéines du complexe NF-κB, ses inhibiteurs (IκB) et ses kinases activatrices (IKK). Dans un second temps, une rétrospective des modèles ayant permis l'étude de la majorité de ses récepteurs, protéines adaptatrices, adaptatrices proximales, ses ligases dégradatives (Ub-K48) ou non (Ub-K63, Ub-M1) ainsi que ses déubiquitinasés (Tableau 3). En se basant sur les gènes de la voie NF-κB retrouvés fréquemment altérés dans les lymphomes B (Tableau 4), nous discutons dans un troisième temps de l'impact du gain ou perte de fonctions des protéines concernées dans l'organisme murin (Tableau 5). La Figure 41 résume les effets de la majorité des modèles murins sur le développement de la cellule B (discutés ci-après).

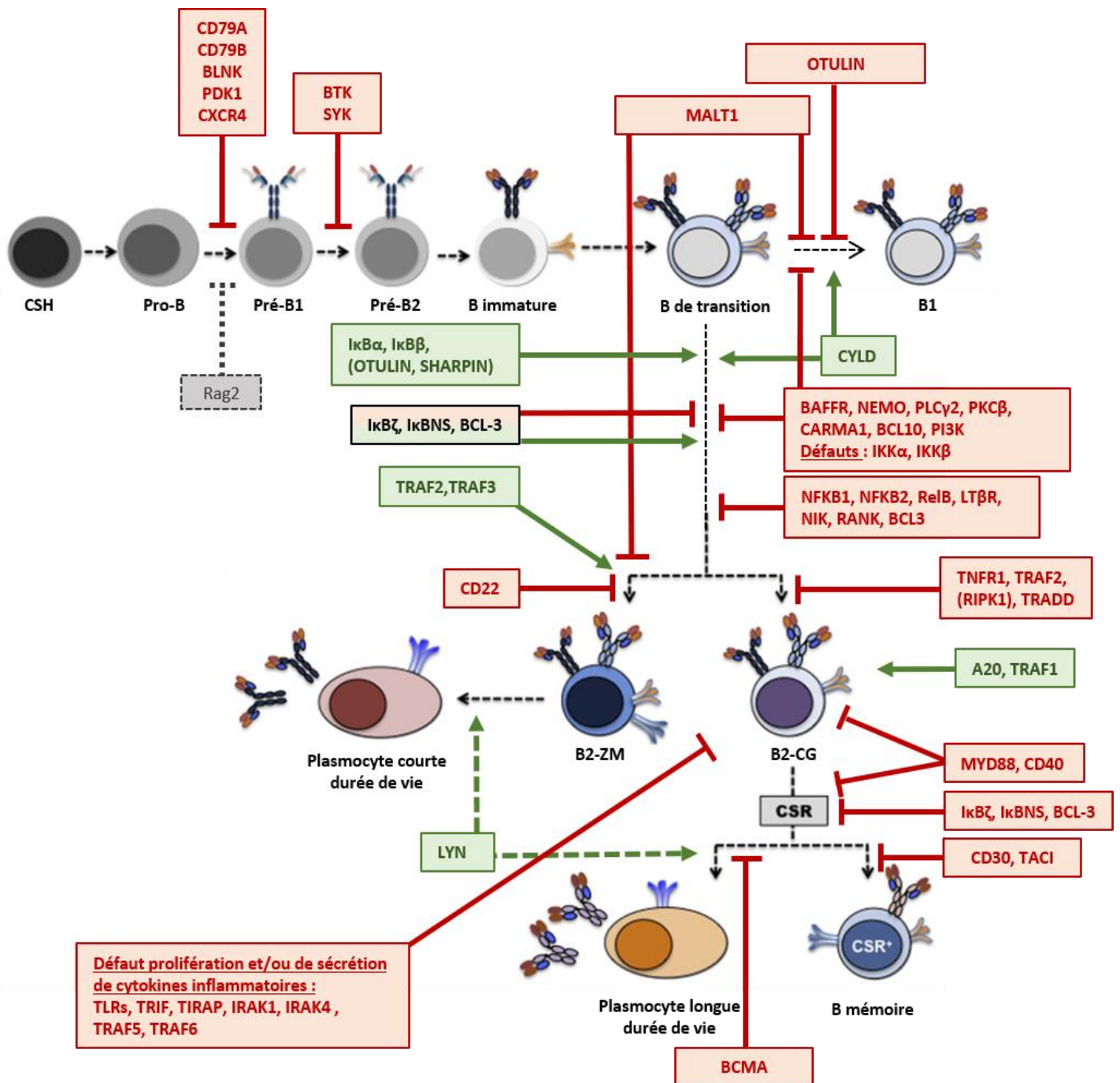


Figure 41 Schéma de l'impact de l'inactivation des gènes en rapport avec l'activation de NF- κ B dans des modèles murins.
 En rouge : impact négatif du « knock out » (KO) ; En vert : impact positif du KO ; L'excès ou le défaut d'activation des gènes invalidés entre parenthèses est hypothétique (Figure adaptée de (Pieper, Grimbacher, et Eibel 2013)).

I.7.3.1. Modèles d'étude des sous unités de NF- κ B, des I κ B et des I κ B kinases

Malgré l'invalidation ubiquitaire des gènes, certaines études nous donnent des informations sur l'impact de NF- κ B dans le développement des cellules B.

Dans un contexte ubiquitaire, seuls les modèles d'inactivation des inhibiteurs prototypiques (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ), *Ikba*^{-/-} (A. A. Beg et al. 1995) et *Ikkb*^{-/-} (J. D. Cheng et al. 1998; Rao et al. 2010; Scheibel et al. 2010), révèlent une activation constitutive d'NF- κ B entraînant une augmentation de la prolifération des cellules B dans ces modèles. Cependant ce phénomène n'est pas observé dans le modèle d'inhibition du 3^{ème} inhibiteur prototypique *Ikbe*^{-/-} (Mémet et al. 1999; Goudeau et al. 2003; Samson et al. 2004), supposant qu'il existerait un mécanisme de compensation par I κ B α et I κ B β .

L'excès ou le défaut d'activation de NF- κ B est plus complexe dans les modèles d'inhibition des inhibiteurs atypiques (I κ B ζ , I κ BNS et BCL-3). Si ces 3 inhibiteurs jouent un rôle dans la CSR, BCL-3 et I κ BNS semblent essentiels à la formation des cellules B-FO, alors que I κ B ζ ne semble essentiel qu'à la réponse aux TLR mais régule négativement la réponse du récepteur CD40 et du BCR. Pour exemple, les modèles *Ikbz*^{-/-} (Yamamoto et al. 2004; Ahn et al. 2019) présente un défaut d'activation du TLR contre une réponse excessive du BCR et de CD40. De plus, les modèles *Ikbns*^{-/-} (Touma et al. 2011; Pedersen et al. 2014), comme les modèles *Bcl3*^{-/-} (G. Franzoso, Carlson, Scharon-Kersten, et al. 1997; Schwarz et al. 1997) ont un défaut d'activation et de prolifération des cellules B. Il est notamment observé une diminution de des populations B de la ZM et B-1 lors de l'inhibition de *Ikbns* voir une absence de CG lors de l'inactivation de *Bcl-3*.

L'invalidation des gènes des sous-unités des complexes NF- κ B et IKK entraînent un défaut d'activation d'NF- κ B mais avec des conséquences phénotypiques différentes.

L'inactivation ubiquitaire des gènes du complexe IKK, *Ikk α* (Hu et al. 1999; Q. Li et al. 1999; Takeda et al. 1999), *Ikk β* (Z.-W. Li et al. 1999) et *Nemo* (Rudolph et al. 2000; Makris et al. 2000; S. Kim et al. 2003)) cause la mort embryonnaire ou à la naissance. Ce sont donc les modèles d'invalidation conditionnelle aux cellules B ciblant les gènes *Ikk β* (Pasparakis, Schmidt-Suppran, et Rajewsky 2002; Z.-W. Li et al. 2003) ou *Nemo* (Sasaki et al. 2006), et le

modèle d'inactivation de la protéine modifiée IKK $\alpha^{AA/AA}$ (les sérines sont remplacées par des alanines dans le domaine HLH de l'IKK α , permettant de supprimer sa possible activation) (Cao et al. 2001; Bonizzi et Karin 2004; Kaisho et al. 2001; Senftleben et al. 2001), qui ont permis d'étudier l'impact de ces protéines sur le développement B.

L'inactivation du gène *Nemo* entraîne un blocage de différenciation des cellules B au stade transitionnel T1 (Sasaki et al. 2006), l'inactivation de *Ikk α* (Kaisho et al. 2001; Senftleben et al. 2001) ou *Ikk β* (Pasparakis, Schmidt-Suppran, et Rajewsky 2002; Z.-W. Li et al. 2003) entraîne un défaut de maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'en périphérie. IKK α permet la dégradation partielle de p100 et phosphoryle préférentiellement p52, protéine du complexe NF- κ B de la voie non-canonique (p52/Rel-B étant le plus fréquent) et IKK β essentiel à la phosphorylation et la dégradation de I κ β , est lié à l'activation de la voie canonique de NF- κ B. Il existerait donc un phénomène de compensation entre la voie canonique non canonique de NF- κ B dans le développement des cellules B.

L'inactivation ubiquitaire des sous-unités NF- κ B ne permet d'obtenir des informations sur le développement des cellules B qu'avec les protéines NFKB1, NFKB2 et RELB. L'importance de la protéine RELA dans le développement embryonnaire ne permet pas de faire d'hypothèse sur son rôle dans le développement des cellules B (Amer A. Beg et al. 1995; Horwitz et al. 1997; Grossmann et al. 1999; 2000; Gugasyan et al. 2004). Quant à la protéine c-REL, elle semble jouer un rôle plus important dans le développement précoce des cellules B dans la moelle osseuse dès le stade cellule souche hématopoïétique et/ou lymphoïde (Grumont et al. 1998; Carrasco et al. 1998; Pohl et al. 2002; Grumont, Strasser, et Gerondakis 2002; S. Cheng et al. 2003). Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèle d'inactivation conditionnelle pour les sous-unités du complexe NF- κ B. Seuls les modèles *Nfkb1*^{-/-} (Sha et al. 1995; Grumont et al. 1998), *Nfkb2*^{-/-} (G. Franzoso, Carlson, Xing, et al. 1997; Ishikawa et al. 1998; Caamaño et al. 1998; Guido Franzoso et al. 1998; Carragher et al. 2004; Lo et al. 2006), et *RelB*^{-/-} (Burkly et al. 1995; F. Weih et al. 1997; D. S. Weih, Yilmaz, et Weih 2001; Falk Weih et Caamaño 2003) mettent en valeur l'implication de NFKB1, NFKB2 et RELB dans le développement du CG et de la ZM ainsi que la réponse du TLR et/ou du BCR et/ou du CD40.

I.7.3.2. Modèles d'étude des protéines principalement activatrices de la voie canonique de NF-κB

Le BCR est fréquemment impliqué dans la lymphomagénèse au côté d'autres récepteurs où la transduction de leur signal relève plus essentiellement de la voie NF-κB. Pour exemple *Lyn* est délété dans 60% des cas de MW (excès de signalisation du BCR) en plus de la mutation MYD88^{L265P} présente dans 90% des cas (excès de signalisation des TLR). Les modèles invalidant les gènes de la voie du BCR, n'impactant pas seulement la voie NF-κB, causent souvent un blocage dans les stades de développement précoce de la cellule B. Cependant, les modèles ciblant des gènes spécifiques de la voie NF-κB sont essentiellement liés à des défauts de maturation après le stade de transition de la cellule B. Cela permet d'émettre l'hypothèse que la voie NF-κB liée au BCR ne permet pas à elle seule de sauver la cellule B lors de l'activation du BCR lors des différentes sélections au cours de la différenciation.

Nous pouvons observer au travers de modèles de délétion ubiquitaire des gènes liés au BCR, que plus la protéine est en amont de la signalisation et plus l'arrêt du développement semble précoce. Même si les cellules B de la majorité de ces modèles sont bloquées avant d'être matures (BCR fonctionnel) certaines études mettent en valeur des faits concernant la voie NF-κB. Par exemple, malgré le blocage au stade pré-B1 des cellules B des modèles invalidant le gène *Btk* (Khan et al. 1995; Kerner et al. 1995), il a été démontré une réduction de la prolifération en réponse à l'activation du récepteur CD40, soulignant la coopération de ces 2 voies de signalisation (Khan et al. 1995; Kerner et al. 1995).

De plus dans les modèles de délétion ubiquitaire, *Plcy2*^{-/-} (D. Wang et al. 2000), *Card11*^{-/-} (B. P. Pappu et Lin 2006), et B spécifique *Pi3k*^{-/-} (H. Suzuki et al. 1999; Fruman et al. 1999) dont les cellules B sont bloquées au stade de transition, il a été observé une plus faible réponse du BCR et CD40 (au même titre que pour le modèle ciblant la BTK). Cependant une nuance a été mise en valeur avec le modèle ciblant *Card11*. Le défaut de prolifération via CD40 est plus important pour les cellules B2-FO (B. P. Pappu et Lin 2006).

L'inactivation ubiquitaire des gènes du complexe CBM, *Card11*^{-/-} (B. P. Pappu et Lin 2006), *Bcl10*^{-/-} (Ruland et al. 2001; Xue et al. 2003) et *Malt1*^{-/-} (Ruland et al. 2003) semblent

bloquer le développement au stade B de transition excepté pour le gène *Malt1* dont son invalidation diminue le nombre de cellules B1 et B2-ZM. Cependant, cela n'empêche pas l'activation de NF-κB des cellules B2 conventionnelles.

Parmi les études d'invalidation ubiquitaire d'autres inhibiteurs de la voie NF-κB, le modèle ciblant la désubiquitineuse CYLD présente une augmentation du nombre de ses cellules B1, B2-CG et B2-ZM (Massoumi et al. 2006; Jin et al. 2007) alors que le modèle invalidant A20 semble ne présenter qu'une augmentation des cellules du CG (E. G. Lee et al. 2000; Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011; Hövelmeyer et al. 2011). Il est aussi intéressant de constater que malgré le caractère inhibiteur de la désubiquitineuse OTULIN, lorsque son gène est invalidé, il semble y avoir une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires mais une réduction des cellules B-1 (Damgaard et al. 2016). L'invalidation de *Lyn*, conduit à une augmentation de lymphoblastes, de plasmocytes. Cependant nous ne savons pas si il s'agit de plasmocytes à longue ou à courte durée de vie (Nishizumi et al. 1995; Chan et al. 1997)

Dans le cadre de l'étude du complexe LUBAC, nous n'avons pas de résultats concernant les gènes *Hoip* et *Hoil*, car les modèles de délétion ubiquitaire sont létaux pour l'embryon (Peltzer et al. 2014; 2018; Fujita et al. 2018). Seul le modèle *Sharpin*^{-/-} est viable et présente une auto-inflammation sévère avec une activation chronique de NF-κB et la présence d'auto-anticorps (Liang 2011).

Par rapport aux modèles visant les gènes de la voie du BCR vu précédemment, les modèles d'inhibition ubiquitaire des gènes des TLR ne bloquent pas la différenciation des cellules B mais semblent impacter l'activation, la prolifération et/ou la sécrétion des cellules B matures en réponse aux PAMPs :

Le modèle *Tlr2*^{-/-} présente un défaut de prolifération via Pam3Cys (Hayashi, Akira, et Nobrega 2005), et le modèle *Tlr4*^{-/-} via stimulation au LPS (Hoshino et al. 1999). Les cellules B du modèle *Myd88*^{-/-} perdent leur réponse au TLR4 et la prolifération est diminuée. De plus, des défauts de formation du CG et de commutation de classe sont aussi observés (Kawai et al. 1999; M. S. J. Lee et al. 2019). Le modèle *Trif*^{-/-}, produit moins d'IFN-β via l'activation des TLR3 et TLR4 (Yamamoto et al. 2003). Le modèle invalidant le gène *Tirap* (MAL) présente une réponse normale au TLR5, TLR7 et TLR9 mais des défauts d'activation de NF-κB et de la

voie des MAP kinases en réponse aux ligands des TLR4, TLR2, TLR1 et TLR6 (Hornig et al. 2002). Le modèle *Irak4*^{-/-} résiste à une dose létale de LPS et présente un défaut de réponse aux ligands des TLR2, 3 et 9 (N. Suzuki et al. 2002). Étonnamment, les splénocytes du modèle *Irak1*^{-/-} présente toujours une activation de NF-κB en réponse au LPS mais n'active plus STAT3 et n'exprime plus l'IL10 (Huang et al. 2004). L'invalidation ubiquitaire du gène *Traf6* dans le modèle *Traf6*^{-/-} entraîne une mort prématurée. Cependant il a été mis en valeur que la prolifération des cellules B est altérée après activation du CD40 et du TLR4 avec une activation de NF-κB réduite (Lomaga et al. 1999).

Les modèles d'inhibition ubiquitaire des gènes liés à la voie du TNFR1, *Tnfr1* (Tkachuk et al. 1998; Milićević et al. 2011), *Tradd* (N.-J. Chen et al. 2008; Pobezinskaya et al. 2008), présentent aussi dans le cas de cellules B matures avec des défauts de formation du CG. De plus, l'inhibition du gène *Ripk1* pourrait donc hypothétiquement causer un défaut de formation du CG cependant le modèle *Ripk1*^{-/-} est létal au stade embryonnaire sur fond C57BL/6 et meurt prématurément sur fond 129/Sv-C57BL/6 (Kelliher et al. 1998).

Contrairement aux modèles précédents, le modèle d'inhibition ubiquitaire *Traf1*^{-/-} a un développement B normal avec une signalisation TNF augmentée, confirmant son rôle inhibiteur dans cette signalisation (Tsitsikov et al. 2001).

La voie NF-κB via le récepteur CD30 ressemble à celle du TNFR1, CD30 recrute directement TRAF1 et 2 sans passer par TRADD et RIPK1. Cependant ces deux récepteurs jouent un rôle différent dans la différenciation des cellules B. Le récepteur CD30 jouerait un rôle plus tardif que TNFR1. Ce dernier participe à la formation du CG alors que CD30 est plus important dans la production d'Ac secondaire. De plus, dans le modèle d'invalidation B spécifique *Cd30*^{-/-}, la CSR est toujours réalisée (Gaspal et al. 2005; Bekiaris et al. 2007).

I.7.3.3. Modèles d'étude des protéines principalement activatrices de la voie non-canonique de NF-κB

Parmi les modèles suivants, l'invalidation des gènes est ubiquitaire, excepté pour l'étude de NIK qui possède en plus un modèle d'invalidation spécifique à la cellule B.

Lors de l'inhibition des gènes spécifiques à la voie non-canonique de NF-κB, le développement B est bloqué autour de la cellule B de transition. Ce blocage est en amont de la cellule B-T2, lorsque le gène *Baffr* est invalidé (Sasaki et al. 2004; Shulga-Morskaya et al. 2004; Sasaki et al. 2006) et en aval lors de l'invalidation de *Ltβr* (Fütterer et al. 1998; Milićević et al. 2011) et de *Nik* (Yin et al. 2001; Hahn et al. 2016). De plus, l'invalidation *Traf5* entraîne un défaut de prolifération après activation du récepteur CD40 (Nakano et al. 1999). L'invalidation de *TRAF2* entraîne une diminution de la réponse aux récepteurs BAFFR et CD40, un défaut de formation du CG mais une ZM élargie (Yeh et al. 1997; Nguyen et al. 1999; Pérez-Chacón et al. 2012). L'élargissement de la ZM est aussi observée lors de l'invalidation de *Traf3* (Y. Xu, Cheng, et Baltimore 1996; Xie et al. 2007; Gardam et al. 2008; C. R. Moore et al. 2012).

I.7.3.4. Modèles d'étude des protéines activatrices de la voie classique et alternative de NF-κB

Les récepteurs engageant les deux types de voies NF-κB jouent un rôle important après la cellule B de transition. Le modèle d'invalidation ubiquitaire *Rank^{-/-}* présente une diminution du nombre de cellules B matures (Dougall et al. 1999), alors que les modèles d'invalidation ubiquitaire *Tacl*, *Bcma* et B spécifique *Cd40*, ont un taux de cellules normal. Cependant l'invalidation de *Cd40* cause un défaut de formation du CG et de commutation de classe (Castigli et al. 1994), l'invalidation de *Tacl* cause un défaut de production d'Ac secondaire (von Bülow, van Deursen, et Bram 2001; Bossen et al. 2008) et l'invalidation de *Bcma* entraîne une altération des plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle osseuse (S. Xu et Lam 2001; O'Connor et al. 2004; Benson et al. 2008)

Tableau 3 Modèles murins permettant l'étude des protéines influençant l'activité de NF- κ B **NON ABERRANTES** dans les lymphomes B. (Classification adaptée de (Wertz et Dixit 2010)).

Protéines influençant l'activité de NF- κ B non aberrantes dans les lymphomes B	Modèles murins (gènes)		Effets	Ressemblances avec les lymphomes chez l'humains	Références
	Surexpression, suractivation	Sous-expression, Inactivation (KO)			
RECEPTEURS					
BAFFR		Baffr ^{-/-}	Reduction du nombre de cellules B transitionnelles tardives et absence de cellules B matures ainsi que de ZM Réduction de la vie du CG après immunisation Défauts dans la production d'Ac dépendant des lymphocytes T, défauts de recombinaison de classe	Non	(Sasaki et al. 2004; Shulga-Morskaya et al. 2004)
	Cd19-cre Ikk2ca (Locus rosa26)	Baffr ^{-/-}	Cellules B matures normales, y compris les cellules B de la ZM	Non	(Sasaki et al. 2006)
BCMA		Bcma ^{-/-}	Altération de la survie des cellules plasmatisques à longue durée de vie de la moelle osseuse	Non	(S. Xu et Lam 2001; O'Connor et al. 2004; Benson et al. 2008)
CD30		Cd30 ^{-/-} dans le modèle Rag2 ^{-/-}	Commutation de classe des cellules B Réponse primaire normale mais défauts de production d'Ac secondaire dépendant des T folliculaires	Non	(Gaspal et al. 2005; Bekiaris et al. 2007)
CD40		Cd40 ^{-/-} dans le modèle Rag2 ^{-/-}	Nombre de cellules B et T normal Pas de prolifération ni de commutation isotypique via activation du CD40 et IL4R mais réponse normale via TL4 et IL4R Défauts dans la formation du centre germinatif après immunisation	Non	(Castigli et al. 1994)
	Cd19-Cre et Cd21-Cre Lmp1/Cd40 (Locus Rosa26)		Les souris Cd19 et Cd21_Cre ont le même profil Splénomégalie et lymphadénopathie, Activation de la voie non canonique de NF- κ B Prolifération et survie des cellules B augmentée avec un profil activé mais défaut de formation du CG Augmentation de l'expression d'IL-10 et de PD-L1	Lymphome de la zone marginale	(Hömig-Hölzel et al. 2008; Vincent-Fabert et al. 2019)
CD79A (Iga)		Mb1-Cre Iga ^{-/-}	Perte du BCR et de la présentation de l'Ag ainsi que de la production d'Ac, Incapacité de former des cellules B matures Recombinaison du locus IgH n'est pas affectée dans les cellules pro-B	Non	(Pelanda et al. 2002; Feldman et al. 2013)
LTβR		It β r ^{-/-}	Manque de ganglions lymphatiques et de plaques de Peyer, et perte de la zone marginale dans la rate Les cellules B et T peu développées ne forment pas de CG	Non	(Fütterer et al. 1998; Milićević et al. 2011)
RANK		Rank ^{-/-}	Ostéopétrose profonde, diminution des cellules B dans la rate, diminution du taux de B mature Perte de la formation des ganglions périphériques	Non	(Dougall et al. 1999)

TACI		Taci ^{-/-}	Perte de la production d'anticorps en réponse aux Ag de type II T dépendant 2 fois plus de cellules B que le modèle Bcma ^{-/-} , hyperplasie au début du stade de transition T1 Diminution de la sécrétion d'IgM et de la survie des plasmocytes via stimulation par BAFF	Non	(von Bülow, van Deursen, et Bram 2001; Bossen et al. 2008)
		Taci ^{-/-} Bcma ^{-/-}	Diminution de la survie des cellules sécrétrices d'anticorps par rapport aux modèles Taci ^{-/-} et Bcma ^{-/-} en réponse au APRIL	Non	(Bossen et al. 2008)
TNFR1		Tnfr1 ^{-/-}	Désorganisation de l'architecture splénique Défauts dans la formation du CG	Non	(Tkachuk et al. 1998; Milićević et al. 2011)
TLR2		Tlr2 ^{-/-}	Défauts de prolifération et de maturation B via Pam3Cys	Non	(Hayashi, Akira, et Nobrega 2005)
TLR4		Tlr4 ^{-/-}	Défauts de réponse au LPS	Non	(Hoshino et al. 1999)
ADAPTATEURS					
MAL (TIRAP)		Tirap ^{-/-}	Réponses normales aux ligands de TLR5, TLR7 et TLR9 Défauts d'activation de NF-κB, des MAP kinases et de production de cytokines en réponse aux ligands de TLR4, TLR2, TLR1 et TLR6	Non	(Horng et al. 2002)
TRADD		Tradd ^{-/-}	Morphologie normale mais Résistance des souris à la toxicité du TNF Défaut dans l'activation de NF-κB et MAP kinases médiée par le TNFα Défauts de formation du CG	Non	(N.-J. Chen et al. 2008; Pobežinskaya et al. 2008)
TRIF		Trif ^{-/-}	Défauts dans l'expression d'IFN-β via activation du TLR3 et TLR4	Non	(Yamamoto et al. 2003)
KINASES ADAPTATRICES PROXIMALES					
IRAK1		Irak1 ^{-/-}	Suppression de l'activation de STAT3 et de l'expression de l'IL10 (expression normale de l'IL-1β)	Non	(Huang et al. 2004)
IRAK4		Irak4 ^{-/-}	Défauts dans la réponse après activation des TLR2, 3, 9 (Perte de la production d'IL6) Souris résistantes à une dose létale de LPS	Non	(N. Suzuki et al. 2002)
PDK1		Mb1-Cre ou Cd21-Cre Pdk1 ^{-/-}	Blocage au stade pro-B pour les souris Mb1-Cre-Pdk1 ^{-/-} Réduction des cellules B du CG, MZ et B1 pour les souris Cd21-Cre-Pdk1 ^{-/-}	Non	(Baracho et al. 2014)
PI3K		Pi3kα ^{-/-} dans le modèle Rag2 ^{-/-}	Mort à la naissance donc étude dans le modèle Rag2 ^{-/-} Réduction du nombre de cellules B1 Réduction de la prolifération des cellules B via activation du BCR ou CD40	Non	(Fruman et al. 1999; H. Suzuki et al. 1999)
RIP1 (RIPK1)		Ripk1 ^{-/-}	Mort embryonnaire (E10.5) avec fond C57BL/6 Mort 3 jours après la naissance avec fond 129/SvC57BL/6	Non	(Kelliher et al. 1998)
LIGASES NON DEGRADATIVES					
HOIL1		Hoil1 ^{-/-}	Mort embryonnaire (E14.5)	Non	(Peltzer et al. 2018; Fujita et al. 2018)
HOIP		Hoip ^{-/-}	Mort embryonnaire (E10.5)	Non	(Peltzer et al. 2014)

	Cd19-Cre Hoip-wt (Locus Rosa26)		Splénomégalie	Non	(Jo et al. 2020)
	Cd19_Cre Myd88 ^{L252P} Hoip-wt (Locus Rosa26)		Splénomégalie, lymphadénopathie, survie plus courte Augmentation du nombre de mutation par rapport au modèle Cd19_Cre_Myd88 ^{L252P} et notamment dans des gènes cible de l'AID	Indolent 20% DLBCL 80%	(Jo et al. 2020)
SHARPIN		Sharpin-/-	Auto-inflammation sévère avec activation d'NF-κB Présence d'autoanticorps	Non	(Liang 2011)
TRAF1		Traf1-/-	Développement normal des cellules B et T Augmentation de la signalisation TNF	Non	(Tsitsikov et al. 2001)
TRAF5		Traf5-/-	Défauts de prolifération via activation du CD40 et CD27 (TNFRSF7)	Non	(Nakano et al. 1999)
TRAF6		Traf6-/-	Mort prématurée (14 jours), souris ostéopérotiques Prolifération induite par CD40 et LPS altérée Activation de NF-κB altérée via IL-1, CD40, and LPS	Non	(Lomaga et al. 1999)
LIGASES DEGRADATIVES					
BIRC2 (cIAP1)		Ciap2-/- ; Cd19-Cre Clap1-/-	Splénomégalie et lymphadénopathie Augmentation du nombre de cellules B dans les ganglions, notamment dans le follicule et la ZM, défauts de formation du CG Suractivité de NFKB2 et survie accrue des cellules B Activation médiée par CD40 compromise	NR	(Gardam et al. 2011)
DESUBIQUITINASES					
OTULIN		Otulin-/-	Mort embryonnaire (E12.5–E14)	Non	(Damgaard et al. 2016)
		Mb1-Cre Otulin-/-	La population B1 semble être réduite Surproduction de cytokines inflammatoire	Non	(Damgaard et al. 2016)
IKK					
IKKα (IKK1)		Ikka-/-	Mort à la naissance	Non	(Hu et al. 1999; Q. Li et al. 1999; Takeda et al. 1999)
		IkkaAA/AA	Défauts dans l'organogenèse lymphoïde et du CG Défaut dans le développement B	Non	(Cao et al. 2001; Bonizzi et Karin 2004; Kaisho et al. 2001; Senftleben et al. 2001)
IKKγ (NEMO)		Nemo+/-	Seulement les femelles sont viables Inflammation de la peau Dégénérescence hépatique sévère et absence d'activation du NF-κB	Non	(Rudolph et al. 2000; Makris et al. 2000)
		Nemo-/-	Mort embryonnaire (E10-11)	Non	(S. Kim et al. 2003)

		Mb1-Cre Nemo-/-	Blocage au stade de transition T1, pas de cellules B1 ni de la ZM	Non	(Sasaki et al. 2006)
IκB					
IκBβ (NFKB1B)		Ikbβ-/-	Souris résistantes au choc d'endotoxine induit par le LPS Réduction de la production de cytokines associée à la septicémie (TNF, IL-1β, et IL-6) Augmentation des cellules B de la zone marginale et réduction du nombre de cellules B naïves	Non	(Rao et al. 2010; Scheibel et al. 2010)
	Ikbβ-wt (Locus <i>Ikbα</i>)	Ikbα-/-	Survie de 35 jours	Non	(J. D. Cheng et al. 1998)
IκBζ		Ikbζ-/-	Mort embryonnaire si fond génétique C57BL/6 Défauts de prolifération des splénocytes en réponse au LPS mais pas avec anti-CD40, IL-4 et anti-IgM Défauts de commutation de classe des cellules B mais amélioration des réactions du centre germinatif splénique suivie d'une augmentation de la production totale d'IgG après immunisation	Non	(Yamamoto et al. 2004; Ahn et al. 2019)
IκBNS		Ikbns-/-	Défauts de prolifération en réponse au LPS et anti-CD40 IgM et IgG3 sont considérablement réduites dans le sérum Les cellules B ont un niveau plus élevé d'IgM de surface Commutation isotypique à IgG3 est considérablement réduite Réduction du nombre de cellules B1 et réduction des cellules B de la zone marginale	Non	(Touma et al. 2011; Pedersen et al. 2014)
SOUS-UNITÉES NF-κB					
NFKB1 (p50, p105 (IκBγ))		Nfkb1-/-	Diminution des cellules B de la ZM et du péritoine Défauts dans la structure des organes lymphoïdes secondaires Défaut dans la CSR Diminution de la prolifération B à la suite d'une stimulation au LPS	Non	(Sha et al. 1995; Snapper et al. 1996; Grumont et al. 1998; Cariappa et al. 2000; Pohl et al. 2002)
	Nfkb1ΔCT/ΔCT		Splénomégalie, lymphadénopathie Infiltration lymphoïde dans divers organes Augmentation de la prolifération B	Non	(Ishikawa et al. 1998)
		Nfkb2-/- Nfkb1-/-	Perte de la zone marginale et des cellules B folliculaires matures Défauts graves du développement des organes lymphoïdes secondaires	Non	(Guido Franzoso, Carlson, Xing, et al. 1997; Lo et al. 2006)
		Nfkb1-/- Relb-/-	Aggravation de l'inflammation des organes observées chez les souris Relb-/-	Non	(F. Weih et al. 1997)
		Nfkb1-/- c-Rel-/-	Diminution de la prolifération des cellules B Cellules B péritonéales CD5 + nettement diminuées Défaut dans la formation du CG et réduction de la ZM	Non	(Pohl et al. 2002; Grumont, Strasser, et Gerondakis 2002)

		Nfkb1-/- Rela-/-	Mort embryonnaire (E13)	Non	(Horwitz et al. 1997)
RelA (p65)		Rela-/-	Mort embryonnaire (E14.5)	Non	(Amer A. Beg et al. 1995)
		Nfkb1-/- Rela-/-	Mort embryonnaire (E13)	Non	(Horwitz et al. 1997)
		Rela-/- c-Rel-/-	Mort embryonnaire (E13)	Non	(Grossmann et al. 1999; 2000)
		Rela-/- c-Rel-/- Tnf-/-	Mort à la naissance	Non	(Gugasyan et al. 2004)
RelB		Relb-/-	Défauts structures organes lymphoïdes secondaires Défauts de formation du CG et d'organisation de la ZM Pas de plaques de Peyer Inflammation de plusieurs organes	Non	(Burkly et al. 1995; D. S. Weih, Yilmaz, et Weih 2001; Falk Weih et Caamaño 2003)
		Nfkb1-/- Relb-/-	Aggravation de l'inflammation des organes observées chez les souris Relb-/-	Non	(F. Weih et al. 1997)

I.7.3.5. Modèles d'étude pour les protéines aberrantes impactant les voies NF- κ B dans les lymphomes B

Parmi les lymphomes agressifs, on retrouve au moins 10 protéines influençant les voies NF- κ B dont les gènes sont fréquemment aberrants, et au moins 26 parmi le lymphome de Hodgkin et les lymphomes indolents (Lymphome folliculaire, lymphome des cellules du manteau, lymphome de la zone marginale splénique, lymphome du MALT et macroglobulinémie de Waldenström). 8 de ces protéines sont retrouvées mutées dans ces deux groupes de lymphomes (Tableau 4).

Tableau 4 Liste des gènes aberrants et fréquence (%) d'apparition dans les lymphomes B agressifs et indolents

(Tableau adapté de (Küppers, Engert, et Hansmann 2012; Marc Seifert, Scholtysik, et Küppers 2013; Schmitz et al. 2014; Hunter et al. 2014; Spina et Rossi 2016; Krysiak et al. 2017; Walker et al. 2018; Pasqualucci 2019; Baron et al. 2019)).

		Aberrations génétiques touchant la voie NF-κB (%) Mutations non-silencieuses, translocations, insertions, délétions, amplifications									
		Lymphomes agressifs				Lymphomes indolents					Non classifié
Protéines influençant l'activité de NF-κB	Gain (+) perte (-) de fonction	DLBCL-GCB	DLBCL-ABC	Lymphome de Burkitt	Myélome multiple	Lymphome Folliculaire	Macroglobulinémie de Waldenström	Lymphome des cellules du manteau	Lymphome de la zone marginale splénique	Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses	Lymphome de Hodgkin
BCL-10	+					2,9				5	
BCL-3	+								Rares		Rares
BIRC3 (cIAP2)	+/-								Rares	15 à 40	
BLNK	+					3,8					
BTK	+					7,6					
CARD11	+		9			10,5			5 à 10		
CD22	-					3,8					
CD79B	+		21			4,8	8 à 15				
c-Rel	+										30
CYLD	-				3,3						Rares
HVCN1	+					7,6					
IKKβ	+								10		
IκBα (NFKBIA)	-				1,3						10 à 20
IκBε (NFKBIE)	-										10 à 20
KLF2	-								20 à 40		
LYN	-						60				
MALT1	+									15 à 40	
MYD88	+		30			1,9	95	6,7	3 à 15	5	

NFKB2 (p52, p100 (IκBδ))	+				1,1	1,9					
NIK	+										25
PLCγ2	+					1,9					
PRKCβ (PKCβ)	+					1,9					
PTEN	-	6 à 11		7							
SYK	+					1					
TNFAIP3 (A20)	-		30			2,9	50	40	10 à 15	15 à 30	40
TRAF2	+/-				2,1						
TRAF3	+/-				5,2				5		Rares
Protéines influençant l'activité de NF-κB	Gain (+) perte (-) de fonction	DLBCL- GCB	DLBCL- ABC	Lymphome de Burkitt	Myélome multiple	Lymphome Folliculaire	Macroglobulinémie de Waldenström	Lymphome des cellules du manteau	Lymphome de la zone marginale splénique	Lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses	Lymphome de Hodgkin
		Lymphomes agressifs				Lymphomes indolents					Non classifié
		Aberrations génétiques touchant la voie NF-κB (%) Mutations non-silencieuses, translocations, insertions, délétions, amplifications									

Modèles d'étude pour les protéines aberrantes impactant la voie NF- κ B dans les lymphomes de Hodgkin

La protéine c-Rel est mutée dans 30% des cas de LH, le locus cRel est amplifié dans 20% des DLBCL (Küppers, Engert, et Hansmann 2012). Le modèle *Cd19-Cre-GAGc-Rel*, permet une surexpression endogénique de *c-Rel* dans les cellules B. Il présente une expansion des cellules B du GC avec une prolifération et une survie accrue avec une commutation de classe des plasmocytes à IgG1 et IgA. Il produit aussi des auto-anticorps en réponse aux auto-antigènes (ADNdb, histones...) (Kober-Hasslacher et al. 2020).

La protéine NIK est aberrante dans 25% des cas de LH (Küppers, Engert, et Hansmann 2012). Le modèle de surexpression conditionnel *Cd19-Cre-Nik-wt* présente une splénomégalie, une lymphadénopathie avec expansion de la ZM. Le modèle *Cd19-Cre-Nik^{ΔT3}* est identique au précédent à l'exception de la délétion de son domaine de liaison à son inhibiteur TRAF3. Ce modèle développe une splénomégalie et une lymphadénopathie plus importante que le modèle précédent avec une expansion de la ZM (Sasaki et al. 2008). Le modèle *Cd19-Cre-Nik-wt_IgH-Bcl6* développe un lymphome à grande cellules B de type DLBCL avec une durée de vie moyenne de 406 jours. Il présente une splénomégalie, une lymphadénopathie avec une prolifération et une survie des cellules B accrue. De plus, la région V du locus IgH est peu mutée (B. Zhang et al. 2015).

Le gène *Bcl3* subit dans de rares cas de LH une translocation dans le locus IgH (Szymanowska et al. 2008). Dans le modèle conditionnel aux cellules B, *E μ -Bcl3*, Les souris sont atteintes d'une splénomégalie et lymphadénopathie avec infiltration de cellules B matures dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et la cavité péritonéale avec augmentation d'IgGA et IgG1 dans le sérum (Ong et al. 1998). Le modèle conditionnel *Cd19-Cre-Bcl3^{B^{OE}}*, permet la surexpression de BCL-3 dans les cellules B. Le modèle développe une splénomégalie avec accumulation de cellules B matures dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, la formation des CG est altérée, la ZM est réduite ainsi que le nombre de cellules B-1 mais le taux d'IgG1 n'est pas altéré (Hövelmeyer et al. 2014).

I κ B ϵ est mutée dans 10 à 20% des LH (Küppers, Engert, et Hansmann 2012), Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèles murins permettant l'étude d'une dérégulation de l'expression de ce gène dans la population de cellule B.

Modèles d'étude pour les protéines aberrantes impactant la voie NF-κB dans les lymphomes B agressifs

Les protéines TRAF2 (2,1% des MM) (Walker et al. 2018) et PTEN (6 à 11% des DLBCL-GCB et 7% des BL) (Pasqualucci 2019) sont retrouvées aberrantes seulement dans les lymphomes agressifs.

Le modèle conditionnel *pHSE-Traf2.DN* exprime *Traf2.DN* via le promoteur *IgH* et ses domaines RING et doigt de zinc sont délétés. Il présente une splénomégalie, une lymphadénopathie avec une augmentation du nombre de cellules B et présente une activation de NF-κB mais pas d'activation de la JNK via l'activation du TNFR et du CD40 (S. Y. Lee et al. 1997; Pérez-Chacón et al. 2012).

Les modèles conditionnels *Cd19-Cre* et *Mx1-Cre-Traf2^{-/-}* présentent une splénomégalie et lymphadénopathie avec une augmentation de cellules B matures, une augmentation de cellules B dans les ganglions et la ZM avec un défaut de formation du CG. L'expression de *c-Rel* et de *Cd21* sont augmentées (Grech et al. 2004; Gardam et al. 2008).

Les cellules B du modèle conditionnel *Mb1-Cre-Pten^{-/-}* sont bloquées à un stade précoce sans expression du BCR en surface et présentent un phénotype anergique avec diminution du taux d'IgM (Setz et al. 2019).

Certaines des protéines activant NF-κB ne sont pas retrouvées mutées mais leur gène peut subir une surexpression due au contexte du lymphome. Pour exemple, la protéine HOIP n'est mutée dans aucun lymphome mais surexprimée dans les cas de DLBCL-ABC et GCB (Jo et al. 2020). Le modèle *Cd19-Cre-Hoip-wt* ou le transgène est insérée dans le locus *rosa* présente une splénomégalie comme le modèle *Cd19-Cre-Hoip-wt-Myd88^{L252P}*. Cependant, ce dernier développe un lymphome de type indolent dans 20% des cas et de type DLBCL dans 80% des cas. Il a en plus une lymphadénopathie et une survie plus courte. Il est aussi observé une augmentation du nombre de mutation dans les gènes cibles de l'AID par rapport au modèle *Cd19-Cre-Myd88^{L252P}* (Jo et al. 2020).

Modèles d'étude des protéines aberrantes impactant la voie NF- κ B dans les lymphomes B indolents

Le gène *Bcl10* subit des mutations (codons stop) dans 2,5% des cas de LF (Krysiak et al. 2017), et une translocation au locus IgH dans 5% des lymphomes du MALT (Du 2016). Dans le modèle *E μ -Bcl10*, le transgène est inséré aléatoirement et entraîne une splénomégalie ainsi qu'une diminution des cellules B folliculaires et B1 mais une augmentation des cellules B de la ZM (Z. Li et al. 2009; Y. Chen et al. 2012).

Le gène *Birc3* (cIAP2 ou API2) subit une translocation t(11;18)(q21;q21) formant une protéine de fusion avec MALT1 dans 15 à 40% des cas de lymphomes du MALT (Du 2016) et dans de rares cas de LZMS (Spina et Rossi 2016). Le modèle *E μ -Api-Malt*, le transgène est inséré aléatoirement. Il présente une augmentation des cellules B de la ZM ainsi qu'une activation de NF- κ B supérieure due à une augmentation de la polyubiquitination de NEMO (Baens et al. 2006).

Le modèle *Ciap2^{-/-}_Cd19-Cre-Ciap1^{-/-}*, possède le gène *Ciap2* invalidé de façon ubiquitaire et *Ciap1* invalidé dans les cellules B. Le modèle développe une splénomégalie et une lymphadénopathie avec une augmentation des cellules B de la ZM et un défaut de formation du GC. La survie des cellules B est accrue ainsi que l'activité d'NF κ B2 (Gardam et al. 2011).

La protéine BTK est aberrante dans 7,6% des cas de LF (Krysiak et al. 2017). Le modèle permettant la production de la BTK humaine via le promoteur endogénique de *Cd19*, *Cd19-h-BTK*, présente une réponse exacerbée via le BCR et une augmentation de la formation du GC et des plasmocytes IgM⁺ avec une augmentation du taux d'IgM. Les taux d'IgG et IgA sont normaux mais il est observé une forte production d'auto-anticorps IgG en réponse aux auto-antigènes (nucléosome et ADNdb) (Kil et al. 2012).

La protéine IKK β est aberrante dans 10% des cas de LZMS (Spina et Rossi 2016). Le modèle conditionnel *Cd19-Cre-Ikk2ca* (Locus Rosa26), permet la production d'une protéine IKK β constitutivement active. Ce modèle développe une splénomégalie tardive (~575 jours) avec une hyperplasie des cellules B et induction de la voie canonique de NF- κ B via engagement du BCR (Sasaki et al. 2004). Ce dernier ne développe pas de lymphome

cependant le modèle *Cy1-Cre-Ikk2ca* associé à *Blimp*^{-/-} permet la formation d'un lymphome clonal à grande cellules B de type DLBCL-ABC. La protéine IKK β constitutivement active est produite dès le stade CSH avec une invalidation constitutive de *Blimp*. Le modèle présente une splénomégalie et une survie en moyenne de 466 jours (Calado et al. 2010).

La délétion de *Lyn* touche 60% des cas de MW (Hunter et al. 2014). Le modèle de délétion ubiquitaire *Lyn*^{-/-} développe une splénomégalie, une lymphadénopathie avec une augmentation de lymphoblastes, de plasmocytes. La prolifération des cellules B est accrue via l'engagement du BCR de plus le modèle produit des auto-anticorps (Nishizumi et al. 1995; Chan et al. 1997).

La PRKC β est aberrante dans 1,9% des LF (Krysiak et al. 2017). Le modèle *E μ -Prkc β II* présente une expansion de la population de cellules B de la MZ et une réduction pour le CG. Le nombre de cellules B en périphérie et B1 dans le péritoine est augmenté ainsi que le taux d'IgM sérique (Azar et al. 2020).

La protéine SYK est rarement mutée dans les cas de LF (Krysiak et al. 2017). Le modèle conditionnel inducible *Mb1-CreER-Tel-Syk* permet l'expression de la protéine de fusion TEL-SYK dans les cellules B grâce au tamoxifène. De ce fait, la protéine SYK constitutivement active, induit la prolifération des cellules B puis la différenciation en plasmocyte à courte durée de vie. BLIMP induit par l'activité de SYK inhibe la régulation de BCL2. Le modèle développe une splénomégalie, une lymphadénopathie. Lorsque ce modèle est croisé avec le modèle *E μ -bcl2* il développe aussi une splénomégalie, une lymphadénopathie et un phénotype plus sévère d'expansion des plasmocytes avec une durée de vie supérieure (Hug et al. 2014).

HVCN1 est aberrante dans 7.6% des cas de LF ainsi que BLNK (3,8%), CD22 (3,8%) et la PLC γ 2 (1,9%) (Krysiak et al. 2017). KLF2 est mutée dans 20 à 40% des LZMS (Spina et Rossi 2016). Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèles murins permettant l'étude d'une dérégulation de l'expression de ces gènes dans la population de cellule B.

Le modèle *IgH-Imp1* développe dans environ 40% des cas un lymphomes des cellules B folliculaires à Ig oligo-/monoclonales. Il présente une splénomégalie avec infiltration des cellules B tumorales dans le foie les poumons et les ganglions (Kulwichit et al. 1998).

La protéine CD40 a aussi été étudiée dans les modèles du fait de son importance dans la maturation des cellules B, la formation du CG et dans le switch isotypique. Les modèles *Cd19-Cre* et *Cd21-Cre-Lmp1/Cd40* permettent de produire la protéine de fusion LMP1 avec la partie intracytoplasmique C terminale de CD40. Ceci ayant pour conséquence une activation constitutive de la voie CD40. Ce modèle développe un lymphome de type LZM. Les modèles de suractivation de CD40 dans les stades B précoces (*Cd19-Cre*) ou plus tardifs au stade B de transition (*Cd21-Cre*) ont le même profil. Ils développent une splénomégalie, une lymphadénopathie. Les cellules B ayant un profil activé, elles activent la voie non canonique de NF- κ B et voient leur prolifération et leur survie augmentées ainsi que l'expression des protéines immunosuppressives IL-10 et PD-L1. Une forte accumulation de cellules B est observée dans le follicule et la ZM, cependant un défaut de formation du CG est observé (Hömig-Hölzel et al. 2008; Vincent-Fabert et al. 2019).

Modèles d'étude pour les protéines aberrantes impactant la voie NF- κ B dans les lymphomes B indolent, agressifs et LH

Ces 8 protéines sont les suivantes : A20, CARD11, CD79b, CYLD, I κ B α , MYD88, NFKB2, TRAF3. Les modèles murins permettant l'étude des protéines influençant l'activité de NF- κ B aberrante dans les lymphomes B sont référencés dans le Tableau 5. Notons, en sus de I κ B α et A20 ciblant directement la voie canonique de NF- κ B, qu'il y a 2 protéines de la voie alterne de NF- κ B (NFKB2, TRAF3), 2 déubiquitinasés (A20, CYLD) et 2 acteurs de la signalisation du BCR (CD79B, CARD11). MYD88 étant le seul représentant de la voie des TLR dans ce cadre.

- Le cas de I κ B α , protéine de la voie classique de NF- κ B :

I κ B α est mutée dans de rares cas de myélome multiple (Walker et al. 2018) et dans 10 à 20% des LH (Küppers, Engert, et Hansmann 2012). L'étude de la protéine I κ B α ayant déjà été décrite dans la section I.7.3.1, ne possédant pas d'inactivation B spécifique, son inactivation ubiquitaire ne permet pas de conclure sur le développement d'un lymphome (A. A. Beg et al. 1995).

- Cas des 2 protéines de la voie alterne de NF-κB (NFKB2, TRAF3) :

Les protéines NFKB2, TRAF3 sont retrouvées mutées dans de rares cas de lymphomes indolents (LH et/ou LF) (Küppers, Engert, et Hansmann 2012; Krysiak et al. 2017) et/ou de myélomes multiples (Walker et al. 2018).

Dans le modèle de suractivation ubiquitaire *Nfkb2^{ΔCT/ΔCT}*, une hyperkératinisation de la rate est observée avec une lymphadénopathie, une augmentation de la prolifération des cellules B ainsi qu'une infiltration des cellules tumorales dans divers organes (Ishikawa et al. 1997).

Le modèle d'inactivation ubiquitaire *Traf3^{-/-}* meurt prématurément avec de graves défauts dans la structure de multiples organes (Y. Xu, Cheng, et Baltimore 1996). Seule la délétion B spécifique du modèle *Cd19-Cre-Traf3^{-/-}* permet le développement d'un lymphome de type LZM avec une splénomégalie, une lymphadénopathie, une hyperplasie B avec une expansion des cellules de la ZM et une hypergammaglobulinémie (Xie et al. 2007; Gardam et al. 2008; C. R. Moore et al. 2012).

Le modèle *Eμ-Traf3* inséré aléatoirement dans le génome permet l'expression du transgène dans les cellules B. Ce modèle présente une splénomégalie, une lymphadénopathie avec une diminution du nombre de cellules B mais développe une plasmocytose, une hypergammaglobulinémie. Il produit des auto-anticorps ainsi qu'un fort taux de cytokines inflammatoires avec augmentation de la réponse via l'engagement des TLR4 et 9. Dans ce modèle, 50% des souris développent des tumeur solides, un carcinome (cancer de la peau) au niveau de la langue (Zapata et al. 2009).

Le modèle *Eμ-Traf3_IgH/Bcl2* possède en plus le gène *Bcl2* inséré dans le locus *IgH* correspondant à la translocation retrouvée dans le LH et les DLBCL. La durée de vie est réduite par rapport au modèle précédent et développe un lymphome de type DLBCL ou plasmocyttaire. Il présente une splénomégalie, une lymphadénopathie, une infiltration lymphoïde avec une expansion B clonale et perte de l'IgD et IgM de surface. Les anticorps sont oligo-/monoclonaux avec hypermutation (Perez-Chacon et al. 2019).

- Cas des 2 déubiquitinasés (A20, CYLD) :

A20 est mutée dans 30% des cas de DLBCL-ABC (Pasqualucci 2019) et dans 2,9 à 50% des cas dans d'autres lymphomes indolents : LF (2,9%) (Krysiak et al. 2017), LH (40%) (Küppers, Engert, et Hansmann 2012), LCM (40%) (Marc Seifert, Scholtysik, et Küppers 2013), LZMS (10-15%) (Spina et Rossi 2016), MALT (15-30%) (Du 2016), MW (50%) (Hunter et al. 2014). L'invalidation ubiquitaire du gène *Tnfrsf25* (A20) cause la mort prématurée due à une inflammation de plusieurs organes (E. G. Lee et al. 2000).

Le modèle conditionnel *Cd19-Cre-a20^{-/-}* (stade B immature CD19^{Hi}) présente une splénomégalie due à l'augmentation de la survie des cellules B avec une hyperplasie plasmocytaire et production d'auto-anticorps ainsi qu'une expansion des cellules T régulatrices. Les cellules B du CG dans les tissus lymphoïdes de l'intestin sont aussi plus nombreuses (Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011; Hövelmeyer et al. 2011). Le modèle invalidant le gène d'une autre déséubiquitinasé, la CYLD, de façon ubiquitaire en plus de l'invalidation de *a20* dans les cellules B (*Cycld^{-/-}_Cd19-Cre-a20^{-/-}*) présente une forte activation B (mais identique au modèle précédent) via l'activation du BCR, TLR4, CD40 et TLR9. Cependant il présente moins de splénocytes que le modèle précédent mais une production supérieure d'IL-6 en réponse au BCR (et identique avec CD40 et TLRs) (Chu et al. 2012).

Les modèles d'invalidation B spécifiques inductibles par administration d'Ifn- α/β et l'ARN double brin (*Mx1-Cre-a20^{-/-}*) ou de tamoxifène (*ERT2-Cre-a20^{-/-}*) présentent une apoptose des cellules B après induction, une anémie progressive et une surproduction de cytokines inflammatoires. Le modèle *ERT2-Cre-a20^{-/-}* meurt quelques jours après l'induction (Nagamachi et al. 2014).

Le modèle conditionnel visant l'inactivation de *a20* dès le stade CSH (*vav-Cre* ou *Cy1-Cre-a20^{-/-}*) meurt quelques jours après la naissance avec une splénomégalie, hépatomégalie et une perte de 50% de la population de la moelle osseuse et 90% du thymus (Nakagawa et al. 2015; Nakagawa et Rathinam 2019).

La protéine CYLD est retrouvée mutée dans de rares cas de lymphomes indolents (LH et/ou LF) (Küppers, Engert, et Hansmann 2012; Krysiak et al. 2017) et/ou de myélomes multiples (Walker et al. 2018).

Le modèle d'inactivation ubiquitaire *Cyld*^{-/-} présente une tumeur des kératinocytes et des follicules pileux avec dans certains cas une hyperplasie sévère des cellules B (Massoumi et al. 2006). Il présente aussi une lymphadénopathie, une augmentation de la taille et du nombre de CG mais plus légère pour la ZM et le nombre de B1. L'inactivation de *Cyld* entraîne une activation constitutive de NF-κB via l'activation de IKKβ et dégradation d'IκBα dans les cellules B. De plus, le modèle présente une splénomégalie lorsque les souris sont immunisées fréquemment aux Ag de globules rouges de mouton (Jin et al. 2007).

- Cas des 2 acteurs de la signalisation du BCR (CD79B, CARD11) :

CD79B est mutée dans 21% des cas de DLBCL-ABC (Pasqualucci 2019) et de 4,8 à 15% dans d'autres lymphomes indolents : LF (4,8%) (Krysiak et al. 2017), MW (8-15%) (Hunter et al. 2014). Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèles murins permettant l'étude d'une surexpression ou une suractivation de la protéine CD79B.

CARD11 est mutée dans 9% des cas de DLBCL-ABC (Pasqualucci 2019) et de 5 à 10,5% des cas dans d'autres lymphomes indolents : LF (10.5%) (Krysiak et al. 2017), LZMS (5-10%) (Spina et Rossi 2016). Dans le modèle conditionnel *Cd19-Cre-Card11-wt*, le transgène est inséré dans le locus *Rosa26* (Knies et al. 2015). Ce modèle présente un phénotype normal et nécessite l'activation du BCR pour activer les cellules B. Le modèle *Cd19-Cre-Card11^{L235L}* permettant la liaison constitutive de CARD11 à BCL10 et MALT1 (complexe CBM) présente des cas de lymphomes de type DLBCL-ABC, ceci se traduisant par une mort après 6 jours avec une splénomégalie et lymphadénopathie, un taux élevé d'IgM, d'IL6, d'IL10 et une forte prolifération B ainsi qu'une infiltration des cellules tumorales dans divers organes (Knies et al. 2015).

- Cas de la protéine adaptatrice MYD88 :

Comme détaillé en section 1.6, *MYD88* est muté dans 30% des cas de DLBCL-ABC (Pasqualucci 2019) et de 1,9 à 95% dans d'autres lymphomes indolents : LF (1,9%) et LCM (6,7%) (de Groen et al. 2019), LZMS (3-15%) (Spina et Rossi 2016), MALT (5%) (Du 2016) et dans la plus de 90% des cas de la MW (Treon et al. 2012; Poulain et al. 2013).

La fréquence de mutation *MYD88*^{L265P} dans la MW confirme que cet évènement est primaire, quasiment indispensable pour l'émergence de ce lymphome. C'est pourquoi des recherches sur son pouvoir oncogénique ont été menées sur plusieurs modèles de souris transgéniques et par plusieurs équipes dans le monde. Le modèle *MYD88* possédant la mutation L252P (orthologue de la mutation L265P retrouvée dans les cas de lymphomes chez l'humain) est exprimée dans les cellules B grâce au modèle *Cd19-Cre-Myd88*^{L252P}. Dans ce modèle le transgène *Myd88*^{L252P} floxé remplace le gène *Myd88-wt* endogène de la souris. La splénomégalie observée est due à une augmentation de la prolifération des cellules B avec une lymphadénopathie occasionnelle et une infiltration des cellules tumorale dans la rate, le foie mais pas dans la moelle osseuse (Knittel et al. 2016). Les modèles *Cd21-Cre* et *Aid-Cre-Myd88*^{L252P} présentent les mêmes symptômes que le modèle précédent avec une proportion plus grande de souris étant atteintes d'un lymphome de type DLBCL (33%) (Knittel et al. 2016). C'est par la co-surexpression conditionnelle de *BCL-2* et de *MYD88*^{L252P} (*Cd19-Cre-Myd88*^{L252P}-*BCL-2*) que les souris présentent dans tous les cas un lymphome de type DLBCL-ABC avec lymphadénopathie, infiltration des cellules tumorales dans la rate, le foie, les ganglions. Les cellules lymphoïdes ont une plus grande taille, une forte augmentation de la prolifération et la sécrétion d'Ig est oligo-/monoclonales (Knittel et al. 2016).

Le modèle *Aid-Cre-h-MYD88-wt* exprimé dans le locus *Col1A1* permet la production de la protéine MYD88 humaine de façon conditionnelle et n'invalide pas le gène *Myd88* murin. Il y est observé une infiltration de plasmocytes dans la moelle osseuse seulement pour les souris jeunes (<112 jours) (Sewastianik et al. 2019). Le modèle *Aid-Cre-h-MYD88*^{L265P} développe une splénomégalie, une lymphadénopathie réduisant la survie des souris. Une infiltration modérée de la moelle osseuse chez les souris jeunes, correspondant à un lymphome de type indolent. La prolifération des cellules B est plus élevée ainsi que l'expression de *Cxcl13* chez les souris plus âgées correspondant à un lymphome de type DLBCL (Sewastianik et al. 2019).

L'ensemble de ces modèles concourent à montrer l'importance de NF- κ B dans les lymphomes B. Ils montrent aussi combien le phénotype est étroitement lié à la voie de signalisation associée à l'activation de NF- κ B.

Tableau 5 Modèles murins permettant l'étude des protéines influençant l'activité de NF-κB **ABERRANTES** dans les lymphomes B. (Classification adaptée de (Wertz et Dixit 2010)).

Protéines influençant l'activité de NF-κB aberrantes dans les lymphomes B	Modèles Murins (gènes)		Effets	Ressemblances avec les lymphomes chez l'humain	Références
	Surexpression, suractivation	Sous-expression, Inactivation (KO)			
RECEPTEURS					
CD22		Cd22 ^{-/-}	Reduction de la ZM	Non	(Samardzic et al. 2002; Shinichi Sato et al. 1996)
	Mb1-Cre h-CD22 (Locus <i>Rosa26</i>)	Cd22 ^{-/-}	Restauration de la ZM par rapport au modèle cd22 ^{-/-}	Non	(Bednar et al. 2017)
CD79B (Igβ)		Igβ ^{-/-}	Blocage au début du stade pré B Pas de formation du CG Recombinaison du locus IgH n'est pas affectée dans les cellules pro-B	Non	(Gong et Nussenzweig 1996)
HVCN1		Hvcn1 ^{def}	Signalisation BCR altérée Sécrétion d'anticorps défectueuses après immunisation	Non	(Capasso et al. 2010)
LMP1	Lmp1 (Locus <i>IgH</i>)		Splénomégalie Infiltration dans le foie les poumons et les ganglions Ig oligo-/monoclonales (ADN) dans le cas des lymphomes	Lymphome folliculaires (42%)	(Kulwichit et al. 1998)
ADAPTATEURS					
BCL-10	Eμ-Bcl10 (Locus aléatoire)		Splénomégalie (6 à 8 semaines) Diminution des cellules B folliculaires et B1a et augmentation des cellules B de la ZM	Lymphomes de la zone marginale	(Z. Li et al. 2009; Y. Chen et al. 2012)
		Bcl10 ^{-/-}	Mort embryonnaire E18.5 dans 30% des cas Altération de la maturation des cellules B FO, des cellules B1 et du développement de la ZM Défauts de prolifération en réponse à l'activation du BCR	Non	(Ruland et al. 2001; Xue et al. 2003)
BLNK		Blnk ^{-/-}	Défauts de signalisation BCR, absence de B matures et peu de B IgM+ Blocage au stade cellulaire pro-B / pré-B	Non	(R. Pappu et al. 1999)
CARD11 (CARMA1)		Carma1 ^{-/-}	Réduction du nombre de cellules B de la ZM Absence de cellules B1 Défauts de réponse au CD40L des cellules B de la ZM et plus sévère pour les cellules B du FO	Non	(B. P. Pappu et Lin 2006)
	Cd19-Cre Card11-wt (Locus <i>Rosa26</i>)		Nécessite l'induction du BCR pour activer les cellules B	Non	(Knies et al. 2015)
	Cd19-Cre Card11 ^{L235LI} (Locus <i>Rosa26</i>)		Mort après 6 jours Splénomégalie et lymphadénopathie, forte augmentation de la prolifération B Taux élevé d'IgM, d'IL-6 et IL-10 Infiltration lymphoïde dans divers organes	ABC-DLBCL	(Knies et al. 2015)
MALT1		Malt1 ^{-/-}	Contrairement au modèle Bcl10 ^{-/-} , l'activation du BCR entraîne toujours la prolifération des cellules B, développement des cellules B2 normal Défauts dans la formation des cellules B1 et de la ZM	Non	(Ruland et al. 2003)

	EμSRa- Api2/Malt1 (Locus aléatoire)		Augmentation des cellules B de la ZM	Non	(Baens et al. 2006)
MYD88		Myd88-/-	Perte de réponse au LPS, diminution de la prolifération des cellules B Défauts de formation du CG et de commutation de classe, switch à IgG1 possible mais pas pour IgG2c	Non	(Kawai et al. 1999; M. S. J. Lee et al. 2019)
	Cd19-Cre myd88 ^{L252P} (Endogène)	Myd88-/-	Splénomégalie, lymphadénopathie occasionnelle, infiltration lymphoïde dans la rate, le foie mais pas dans la moelle osseuse Augmentation de la prolifération B	Non	(Knittel et al. 2016)
	Cd21-Cre et Aid-Cre Myd88 ^{L252P} (Endogène)	Myd88-/-	Splénomégalie, lymphadénopathie occasionnelle, infiltration lymphoïde dans la rate, le foie mais pas dans la moelle osseuse Augmentation de la prolifération B	Non	(Knittel et al. 2016)
	Cd19-Cre Myd88 ^{L252P} (Endogène) <i>BCL-2</i> (Locus <i>Rosa26</i>)	Myd88-/-	Lymphadénopathie, infiltration lymphoïde dans la rate, le foie et les ganglions Grandes cellules lymphoïdes Forte augmentation de la prolifération	ABC-DLBCL	(Knittel et al. 2016)
	Aid-Cre h-MYD88-wt (Locus <i>Col1A1</i>)		Infiltration de plasmocytes dans la moelle osseuse (souris jeune <112 jours)	Non	(Sewastianik et al. 2019)
	Aid-Cre h-MYD88 ^{L265P} (Locus <i>Col1a1</i>)		Splénomégalie, Infiltration de plasmocytes dans la moelle osseuse et prolifération modérée (souris jeunes <112 jours), forte prolifération (souris âgées) Taux d'IL-6 élevé (peau submandibulaire, souris jeunes) Taux de CXCL13 élevé (sérum, souris âgées)	DLBCL (âgées)	(Sewastianik et al. 2019)
	Cd19-Cre Myd88 ^{L252P} Hoip-wt (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie, lymphadénopathie, survie plus courte Augmentation du nombre de mutation par rapport au modèle Cd19_Cre_Myd88 ^{L252P} et notamment dans des gènes cibles de l'AID	DLBCL 80%	(Jo et al. 2020)
TRAF3		Traf3-/-	Mort 10 jours après la naissance Défauts graves dans les structures de multiples organes	Non	(Y. Xu, Cheng, et Baltimore 1996)
		Cd19-Cre Traf3-/-	Splénomégalie et lymphadénopathie Hyperplasie B, hypergammaglobulinémie Expansion des cellules de la ZM	Lymphome de la zone marginale	(Xie et al. 2007; Gardam et al. 2008; C. R. Moore et al. 2012)
	Eμ-Traf3 (Locus aléatoire)		Splénomégalie, lymphadénopathie Durée de vie réduite et développement d'une cachexie Diminution du nombre de cellule B mais développement d'une plasmocytose et hypergammaglobulinémie, auto-anticorps Augmentation du taux de cytokines inflammatoires Augmentation de la réponse via l'activation des TLR4 et 9 (LPS, CpG) Réduction de NIK mais signalisation normale via CD40 et BAFFR	Non	(Zapata et al. 2009)
	Eμ-Traf3 Bcl-2 (Locus <i>IgH</i>)		Splénomégalie, lymphadénopathie, infiltration lymphoïde Durée de vie réduite par rapport au modèle <i>Eμ-Traf3</i> Oligo-/monoclonale, réarrangement V _H DJ _H et hypermutation Expansion B clonale, perte de l'IgD et IgM de surface	DLBCL ou lymphome lymphoplasmocytaire	(Perez-Chacon et al. 2019)

KINASES ADAPTATRICES PROXIMALES					
BTK		Btk ^{-/-} dans le modèle Rag2 ^{-/-}	Réduction du nombre de cellules B1, blocage entre les stades pré-B1 et pré-B2 Réduction de la prolifération des cellules B via activation du BCR ou CD40	Non	(Khan et al. 1995; Kerner et al. 1995)
	Cd19-h-BTK		Formation du CG et de plasmocyte IgM ⁺ avec augmentation du taux d'IgM (IgG et IgA normal) Forte production d'autoanticorps IgG (anti-nucléosome et anti ADNdb) Forte réponse via engagement du BCR	Non	(Kil et al. 2012)
LYN		Lyn ^{-/-}	Splénomégalie, lymphadénopathie, augmentation du nombre de lymphoblastes, de plasmocytes Production d'autoanticorps et suractivation des MAP kinases Prolifération accrue via activation du BCR	Non	(Nishizumi et al. 1995; Chan et al. 1997)
PRKCβ (PKCβ)		Pkc-β ^{-/-}	Nombre réduit de cellules B1, prolifération des cellules B réduite Faible activation de NF-κB via l'engagement du BCR	Non	(Weiss et Littman 1994; Leitges et al. 1996)
	Eμ-PkcβII		Expansion de la population de cellules B de la MZ et réduction de la population de cellules B des follicules Augmentation du nombre de cellules B immatures en périphérie, du nombre de B1 dans le péritoine, ainsi que du taux d'IgM sérique	Non	(Azar et al. 2020)
SYK		Syk ^{-/-}	Mort embryonnaire due à une hémorragie Altération de la différenciation B, blocage au stade pré-B due à la perturbation de la signalisation du pré-BCR	Non	(A. M. Cheng et al. 1995)
	Mb1-CreER TEL-Syk (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie, lymphadénopathie Induit de la prolifération puis la différenciation en plasmocyte à courte durée de vie BLIMP induit par l'activité de SYK inhibe la régulation de BCL-2	Non	(Hug et al. 2014)
	Mb1-CreER TEL-Syk Eμ-BCL-2 (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie, lymphadénopathie Phénotype sévère d'expansion des plasmocytes, augmentation de la survie	Non	(Hug et al. 2014)
LIGASES NON DEGRADATIVES					
TRAF2		Traf2 ^{-/-}	Mort prématurée (~12 jours) Masse musculaire réduite, sévère atrophie de la rate et du thymus Lymphopénie, défauts de formation du CG mais ZM élargie Défauts d'activation des voies CD40 et BAFFR	Non	(Yeh et al. 1997; Nguyen et al. 1999; Pérez-Chacón et al. 2012)
		pHSE-Traf2.DN (Engogène)	Splénomégalie et lymphadénopathie Augmentation du nombre de cellules B, défaut de formation du CG mais ZM élargie Activation de NF-κB mais pas de JNK via TNFR et CD40	Lymphome lymphocytaire	(S. Y. Lee et al. 1997; Pérez-Chacón et al. 2012)
		Cd19-Cre et Mx1-Cre Traf2 ^{-/-}	Splénomégalie et lymphadénopathie Augmentation du nombre de cellules B matures et du nombre total de cellules B dans les ganglions lymphatiques et de la ZM, défaut de formation du GC Surexpression de c-Rel et de la protéine membranaire CD21	Non	(Grech et al. 2004; Gardam et al. 2008)
LIGASES DEGRADATIVES					
BIRC3 (CIAP2, API2)	Eμ-API2/Malt1 (Locus aléatoire)		Augmentation du nombre de cellules B de la ZM Augmentation de l'activation de NF-κB et de la polyubiquitination de NEMO (splénocytes)	Non	(Baens et al. 2006)

		Ciap2 ^{-/-} ; Cd19-Cre Ciap1 ^{-/-}	Splénomégalie et lymphadénopathie Augmentation du nombre de cellules B dans les ganglions, notamment dans le follicule et la ZM, défauts de formation du CG Suractivité de NFκB2 et survie accrue des cellules B Activation médiée par CD40 compromise	Non	(Gardam et al. 2011)
DESUBIQUITINASES					
CYLD		Cyld ^{-/-}	Tumeurs des kératinocytes des follicules pileux. Certain cas d'hyperplasie sévère, lymphadénopathie, augmentation de la taille et du nombre de GC de légère augmentation de la ZM dans la rate ainsi que du nombre de B1 Activation constitutive de NF-κB via IKKβ et dégradation d'IκBα Forte réponse à l'exposition aux Ag de globules rouges de mouton (splénomégalie)	Non	(Massoumi et al. 2006; Jin et al. 2007)
		Cyld ^{-/-} Cd19-Cre a20 ^{-/-}	Forte activation B via engagement du BCR, TLR4, CD40, TLR9 mais identique au modèle Cd19_Cre_A20 ^{-/-} Moins de splénocytes que le modèle Cd19_Cre_A20 ^{-/-} Production d'IL6 supérieur au modèle Cd19_Cre_A20 ^{-/-} via activation du BCR mais identique via CD40 et TLRs	Non	(Chu et al. 2012)
TNFAIP3 (A20)		a20 ^{-/-}	Mort due à l'inflammation de plusieurs organes à partir de 7 jours	Non	(E. G. Lee et al. 2000)
		a20 ^{-/-} Myd88 ^{-/-}	Empêche la létalité prématurée observé pour le modèle a20 ^{-/-}	Non	(Turer et al. 2008)
		Cd19-Cre a20 ^{-/-}	Splénomégalie, hyperplasie plasmocytaire, auto-anticorps Augmentation de la prolifération et de la survie des cellules B Formation de cellules B GC dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin Expansion des cellules T régulatrices, de type T effectrices et myéloïdes	Non	(Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011; Hövelmeyer et al. 2011)
		Cyld ^{-/-} Cd19-Cre a20 ^{-/-}	Forte activation B via engagement du BCR, TLR4, CD40, TLR9 mais identique au modèle Cd19_Cre_a20 ^{-/-} Moins de splénocytes que le modèle Cd19_Cre_a20 ^{-/-} Production d'IL6 supérieur au modèle Cd19_Cre_a20 ^{-/-} via activation du BCR mais identique via CD40 et TLRs	Non	(Chu et al. 2012)
		Mx1-Cre a20 ^{-/-}	Apoptose des cellules B, anémie Surproduction de cytokines pro-inflammatoires	Non	(Nagamachi et al. 2014)
		ERT2-Cre a20 ^{-/-}	Mort quelques jours après activation par tamoxifène, apoptose fulminante, myéloprolifération, lymphocytopénie et anémie progressive Production excessive de cytokines pro-inflammatoires	Non	(Nagamachi et al. 2014)
		vav-Cre ou Cy1-Cre a20 ^{-/-}	Mort quelques jours après la naissance (~21) Splénomégalie, hépatomégalie, perte de 50% de la population de la moelle osseuse et 90% dans le thymus Signalisation NF-κB et IFN-γ augmentée, hyperprolifération des HSC	Non	(Nakagawa et al. 2015; Nakagawa et Rathinam 2019)
KINASES ACTIVATRICES DES IKK					
NIK		Nik ^{-/-}	Défauts de structures dans les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer, la rate et le thymus	Non	(Yin et al. 2001)
		Cd19-Cre Nik ^{-/-}	Réduction drastique du nombre de B matures (FO et MZ) Altération de la commutation de classe	Non	(Hahn et al. 2016)
	Cd19-Cre Nik-wt (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie et lymphadénopathie Expansion de la ZM	Non	(Sasaki et al. 2008)

	Cd19-Cre NikΔT3 (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie et lymphadénopathie plus importante que dans le modèle NIKwt Expansion de la ZM	Non	(Sasaki et al. 2008)
	Cd19-Cre Nik-wt (Locus <i>Rosa26</i>) Bcl-6 (Locus <i>IgH</i>)		Splénomégalie et lymphadénopathie, grande cellule B, survie médiane 406 jours Prolifération et survie des cellules B accrue Nombre réduit de mutations sur la région V du locus <i>IgH</i>	DLBCL	(B. Zhang et al. 2015)
IKK					
IKKβ (IKK2)		<i>Ikkb</i> ^{-/-}	Mort embryonnaire (E13)	Non	(Z.-W. Li et al. 1999)
		Cd19-Cre <i>Ikkb</i> ^{-/-}	Réduction des cellules B FO et ZM ainsi que tous les sous-ensembles de cellules B périphériques Défaut général de la capacité à activer la voie de signalisation canonique NF-κB (LPS, anti-CD40 et anti-IgM)	Non	(Pasparakis, Schmidt-Suppran, et Rajewsky 2002; Z.-W. Li et al. 2003)
	Cd19-Cre <i>Ckk2ca</i> (Locus <i>Rosa26</i>)		Survie similaire aux souris sauvages Splénomégalie tardive (550 à 600 jours) Hyperplasie des cellules B et prolifération induite par anti-IgM augmente fortement l'activité canonique de NF-κB	Non	(Sasaki et al. 2006)
	Cd19-Cre <i>Ikk2ca</i> (Locus <i>Rosa26</i>)	<i>Baffr</i> ^{-/-}	Cellules B matures normales, y compris les cellules B de la ZM	Non	(Sasaki et al. 2006)
	Cy1-Cre <i>Ikk2ca</i> (Locus <i>Rosa26</i>)	<i>Blimp1</i> ^{-/-}	Splénomégalie Lymphome clonal à grandes cellules B Survie médiane 466 jours	ABC-DLBCL	(Calado et al. 2010)
IkB					
BCL-3		<i>Bcl3</i> ^{-/-}	Architecture splénique altérée, défaut de formation du CG Diminution des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires Défaut dans réponse humorale	Non	(G. Franzoso, Carlson, Scharon-Kersten, et al. 1997; Schwarz et al. 1997)
	Eμ-Bcl3 (Locus aléatoire)		Splénomégalie et accumulation de cellules B matures dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et la cavité péritonéale Augmentation des IgG1 et IgA dans le sérum	Non	(Ong et al. 1998)
	Cd19-Cre <i>Bcl3</i> ^{BOE} (Locus <i>Rosa26</i>)		Splénomégalie accumulation de cellules B matures dans les organes lymphoïdes secondaire Diminution du nombre de cellules B dans la zone marginale et réduction significative du nombre de cellules B-1 Inhibition de la formation du CG et taux d'IgG1 non altéré	Non	(Hövelmeyer et al. 2014)
IkBα (NFKBIA)		<i>Ikba</i> ^{-/-}	Mort après 7 à 10 jours due à une inflammation généralisée Augmentation de la prolifération B à la suite de stimuli mitogéniques	Non	(A. A. Beg et al. 1995)
	<i>Ikbβ</i> -wt (Locus <i>ikba</i>)	<i>Ikba</i> ^{-/-}	Survie de 35 jours	Non	(J. D. Cheng et al. 1998)
		<i>Ikba</i> ^{-/-} <i>Ikbe</i> ^{-/-}	Mort juste après la naissance Absence de cellules B et T, nombre réduit de cellules NK	Non	(Goudeau et al. 2003; Samson et al. 2004)
IkBε (NFKBIE)		<i>Ikbe</i> ^{-/-}	Augmentation du switch isotypique et de la production d'IgM, d'IgG1 et de cytokines (IL-1, IL-6) Pas de modification de la prolifération B	Non	(Mémet et al. 1999)

		Ikba-/ Ikbe-/-	Mort juste après la naissance Absence de cellules B et T, nombre réduit de cellules NK	Non	(Goudeau et al. 2003; Samson et al. 2004)
SOUS-UNITÉES NF-κB					
c-Rel		c-Rel-/-	Augmentation de l'apoptose des cellules B Défaut de cycle avec blocage en phase G1/S et de switch isotypique	Non	(Grumont et al. 1998; S. Cheng et al. 2003; Pohl et al. 2002)
		c-RelΔCT/ΔCT	Moelle osseuse hypoplasique, hématopoïèse extramédullaire, splénomégalie	Non	(Carrasco et al. 1998)
		Nfkb1-/ c-Rel-/-	Diminution de la prolifération des cellules B Cellules B péritonéales CD5 + nettement diminuées Défaut dans la formation du CG et réduction de la ZM	Non	(Pohl et al. 2002; Grumont, Strasser, et Gerondakis 2002)
		Rela-/ c-Rel-/-	Mort embryonnaire (E13)	Non	(Grossmann et al. 1999; 2000)
		Rela-/ c-Rel-/ tnf-/-	Mort à la naissance	Non	(Gugasyan et al. 2004)
	Cd19-Cre CAG-c-Rel (Endogène)		Expansion des cellules B du CG, prolifération et survie accrue Production d'auto-anticorps Switch des plasmocytes à IgG1 et IgA et diminution de la quantité d'IgM sérique	Non	(Kober-Hasslacher et al. 2020)
NFKB2 (p52, p100 (IkBδ))		Nfkb2-/-	Altérations de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires, défaut de formation des centres germinatifs Absence de zone marginale splénique Diminution de la prolifération B en réponse au LPS et CD40L	Non	(Caamaño et al. 1998; Guido Franzoso et al. 1998; Carragher et al. 2004)
	nfkb2ΔCT/ΔCT		Hyperkératinisation de la rate Lymphadénopathie, infiltration lymphoïde dans divers organes Augmentation de la prolifération B	Non	(Ishikawa et al. 1997)
		Nfkb2-/ Nfkb1-/-	Perte de la zone marginale et des cellules B folliculaires matures Défauts graves du développement des organes lymphoïdes secondaires	Non	(Guido Franzoso, Carlson, Xing, et al. 1997; Lo et al. 2006)
AUTRES ENZYMES					
PLCγ2		Plcy2-/-	Réduction du nombre de cellules B matures et B1 Réduction de la prolifération des cellules B via activation du BCR ou CD40	Non	(D. Wang et al. 2000)
PTEN		Mb1-Cre Pten-/-	Blocage au stade cellule B précoce, pas d'expression du BCR en surface, phénotype anergique, diminution du taux d'IgM Rétablissement de l'expression de l'IgD et du développement des cellules B FO grâce à FoxO1 (dépendant de PTEN) via transduction	Non	(Setz et al. 2019)

II- Objectifs

Malgré les traitements des patients symptomatiques avec le rituximab couplé à la chimiothérapie, la MW reste incurable de nos jours et de nouvelles stratégies sont donc nécessaires (Baron et al. 2019). Notre laboratoire a été parmi les 1^{ers} à rapporter la mutation de MYD88 dans la MW (Gachard et al. 2013). A l'époque, aucun modèle animal de lymphome avec MYD88 muté n'existait. Nous avons voulu créer un tel modèle murin en posant la question du rôle de MYD88 dans la transformation lymphome B (indolent/agressif). La mutation MYD88^{L265P} étant présente dans plus de 90% des cas de la MW et 30% des cas de DLBCL-ABC nous avons reproduit l'expression de son orthologue chez la souris, MYD88^{L252P} dans le locus *Rosa* et conditionnellement aux cellules B grâce à l'expression de la CRE-recombinase via le promoteur du gène *Cd19*.

- Le premier objectif a donc été de caractériser ce nouveau modèle murin suractivant NF-κB via la protéine mutée MYD88^{L252P} dans les cellules B et développant un lymphome ressemblant à la MW

L'émergence d'un lymphome dépend à la fois de la capacité des cellules tumorales à survivre et/ou à proliférer, mais aussi à échapper à l'immunité. Les cellules tumorales de certains LNHB, comme les cellules B immortalisées par virus d'Epstein Barr (EBV), sont aptes à moduler la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le facteur de transcription NF-κB est très fréquemment suractivé dans la lymphomagénèse des cellules B via la dérégulation des voies du BCR, TLR/IL1R, CD40, Fn14, BAFFR, LTβR, CD30, RANK, BCMA, TACI, TNFR1, RCPGs mais aussi LMP1. Il permet la modulation de l'expression d'une multitude de gènes (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>) entraînant la survie et la prolifération des cellules malignes mais aussi la modulation du micro-environnement. Parmi les gènes dérégulés par NF-κB, on retrouve des gènes en commun avec la signature transcriptomique de l'échappement immunitaire des LNH (Laurent et al. 2015) : *IDO1*, *CCL22*, *IL10*, *CD80*, *PTGS2*, *ICOS*, *LGALS3*, *CSF1*, *MYC*, *IL13*, *CD86*, *CD274*, *CCL2*, *HGF*, *IL6* et *PIM1*. En parallèle au premier objectif, nous nous sommes intéressés à *CD274* (PD-L1), gène de l'échappement immunitaire ciblé et régulé positivement par le facteur de transcription NF-κB. Nous avons alors réalisé 2 autres études portant sur le microenvironnement tumoral des lymphomes B :

- La première, chez l'humain, sur le rôle de l'échappement immunitaire *in vitro* des cellules B infectées par l'EBV en latence III ainsi que leurs conséquences sur le microenvironnement tumoral et notamment sur l'activité des cellules T autologues
- La deuxième, chez la souris, comme modèle de thérapies en phase préclinique *in vivo* visant l'échappement immunitaire dans un modèle murin développant un lymphome de type LZM via l'expression d'une protéine chimérique LMP1/CD40 par les cellules B

III- Résultats

III.1. Caractérisation d'un modèle murin développant un lymphome proche de la MW

III.1.1. Synthèse de l'article

L'aberration du gène *MYD88*, dans plus de 90% des cas de MW, semble être l'évènement génétique primaire de cette maladie. Cependant le rôle exact de *MYD88* dans l'émergence d'un clone lymphoplasmocytaire de cellules B n'est pas connue (Baron et al. 2019). Afin de connaître le rôle de *MYD88* dans la lymphomagénèse plusieurs modèles ont été créés. L'expression de *MYD88* avec la mutation humaine L265P dans le modèle de Sewastianik *et al.*, ne permet pas le développement d'un lymphome chez la souris ce qui révèle l'importance de la configuration de la protéine murine dans la lymphomagénèse (Sewastianik et al. 2019). Lorsque la mutation murine *MYD88*^{L252P} (orthologue murin de la mutation L265P chez l'humain) est introduite dans le locus endogène de *Myd88*, (modèle de Knittel *et al.*), la majorité des souris développe un désordre lymphoprolifératif-B (DLP-B) et développe un lymphome de type DLBCL-ABC lorsque *BCL-2* est surexprimé avec l'expression endogénique de *Myd88*^{L252P} (Knittel et al. 2016).

Quand nous avons commencé, il n'existait pas de modèle associé à *MYD88*^{L252P}. A l'heure actuelle il n'existe toujours pas de modèle développant un lymphome indolent caractéristique de la MW. Nous avons réalisé un nouveau modèle de souris dans lequel le cDNA de *Myd88* possédant la mutation L252P, est inséré dans le locus *Rosa26* avec une expression de la protéine restreinte aux cellules B. Or ces souris développent un lymphome lymphoplasmocytaire clonal à cellules B (de type LLP) avec un pic d'IgM sérique ainsi d'un taux plus élevé de plasmocytes dans la moelle osseuse et un continuum de différenciation plasmocytaire chez les souris jeunes. Nous avons par la suite mis en évidence une forte similarité entre la signature transcriptomique de cellules B purifiées de patients atteints de la MW, porteur de la mutation *MYD88*^{L265P}, avec celle des souris *MYD88*^{L252P} développant un lymphome de type LLP. Parmi ces gènes dérégulés nous avons retrouvé 34 gènes de la signature plasmocytaire surexprimés parmi le réseau de *Xbp1*.

L'étude des souris jeunes nous a aussi permis de déceler dans un premier temps l'apparition d'une plus forte concentration sérique en IgG et modérée en IgM au cours d'une hypergammaglobulinémie pour les souris de 6 à 8 mois, puis un pic d'IgM pour les souris de plus de 8 mois. La concentration en IgM, étant corrélée avec la taille de la rate (splénomégalie),

permet de suivre l'évolution du clone jusqu'au développement du lymphome de type MW après 8 mois. Cette hypergammaglobulinémie à prédominance IgG précédant le pic d'IgM pourrait donc prédire le développement du lymphome

Le potentiel transformant de MYD88 a donc bel et bien été confirmé au travers de son aptitude à former un clone lymphoplasmocytaire ainsi qu'à développer un lymphome indolent chez la souris. Ce modèle peut être très intéressant pour des tests précliniques ainsi que pour l'étude des LLP. Ainsi, même si des différences existent, notre modèle est le 1^{er} se rapprochant de la MW humaine.

III.1.2. Article

Continuous activation of MYD88 expands and then transforms IgM differentiating plasma cells.

Running title: IgM lymphoplasmcytic differentiation is at the heart of MYD88 related B-cell transformation

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

¹ UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL. University of Limoges, and hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges; France.

² UMR CANTHER « CANcer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to THERapies » INSERM 1277-CNRS 9020 UMRS 12. University of Lille., Hematology laboratory, Biology and pathology center, CHU de Lille, 59000 Lille, France.

³ Institut de Recherche Saint-Louis, EMiLy, INSERM U1160, University of Paris, France.

⁴ Pathology Department, Hospital University Center of Bordeaux, Bordeaux, France.

⁵ Laboratory of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France.

***Correspondings Authors:** Christelle Vincent-Fabert and Jean Feuillard: UMR CNRS 7276/INSERM 1262 CRIBL “Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations”, CBRS “Centre de Biologie et de Recherche en Santé”, Dupuytren Hospital University Center, University of Limoges, hematology Laboratory of Dupuytren CHU, 2 rue du Pr Descottes, 87025 Limoges, France. Ph: +33 (0)5 19 56 42 23; fax: +33 (0)5 55 43 58 97, and email: christelle.vincent-fabert@unilim.fr; jean.feuilleard@unilim.fr.

† C.O. and L.R. contributed equally to this work.

‡NG and SP contributed equally to this work

Word count in text: 6243

Total number of Figures: 10

Supplementary Tables: 10

Supplementary Figures: 5

References: 53

Key words: B-cell lymphoma, MYD88 L265P mutation, lymphoplasmacytic lymphoma,

Waldenström's Macroglobulinemia, IgM monoclonal secretion, plasma cell.

Abstract

Activating mutations of *MYD88* (*MYD88^{L265P}* being the far most frequent) are found in most cases of Waldenström macroglobulinemia (WM) as well as in various aggressive B-cell lymphoma entities with features of plasma cell (PC) differentiation, such as activated B-cell type diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

To understand how MYD88 activation exerts its transformation potential, we have developed a new mouse model in which the MYD88^{L252P} protein, the murine ortholog of the human MYD88^{L265P} one, is continuously expressed in CD19 positive B-cells together with the Yellow Fluorescent Protein.

In the bone marrow, IgM B and plasma cells were expanded with a CD138 expression continuum from IgM^{high} CD138^{low} to IgM^{low} CD138^{high} cells and with the progressive loss of the B220 marker.

Serum protein electrophoresis (SPE) longitudinal analysis of 40 MYD88^{L265P} mice ranging 16 to 56 weeks old demonstrated that ageing was first associated with serum polyclonal hypergammaglobulinemia (hyper Ig) and then with a monoclonal immunoglobulin (Ig) peak related to progressive increase of IgM serum levels.

In the spleen, all MYD88^{L265P} mice exhibited spleen enlargement which size was directly correlated with the SPE profile, being maximum for monoclonal Ig peaks. MYD88^{L265P} mutation was very early associated with IgM PC differentiation. Related to early increase of Ki67 proliferation index, IgM lymphoplasmacytic (LP) and plasma cells continuously expanded with age being first associated with hyper Ig and then with monoclonal Ig peak. Monoclonal Ig peak was constantly associated with a LP-like B-cell lymphoma of the spleen. Clonal expression of both membrane and secreted μ chain isoforms was demonstrated at the mRNA levels by high throughput sequencing. The MYD88^{L252P} tumor transcriptomic signature

pointed on both proliferation and canonical NF- κ B p65/RelA activation. *MYD88^{L265P}* WM comparison demonstrated that *MYD88^{L252P}* tumor also had the typical lymphoplasmacytic transcriptomic signature of WM bone marrow purified tumor B-cells.

Altogether these results demonstrate for the first time that MYD88 specifically exerts its transformation potential in IgM differentiating B-cells. Since *MYD88^{L252P}* transforming potential targets the IgM PC differentiation continuum, it provides an interesting preclinical model for development of new therapeutic approaches in both WM and MYD88 associated aggressive DLBCLs.

Contribution to the field

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is a rare incurable indolent B-cell lymphoma characterized by a bone marrow infiltration of immunoglobulin M (IgM)-expressing B cells and monoclonal IgM secretion in blood. WM is genetically identified by the presence of a mutation in the adapter protein MYD88 (MYD88^{L265P}), which is present in up to 90% of patients. This mutation is also found in aggressive B-cell lymphomas with partial plasma cell engagement. This gain of MYD88 function leads to a constitutive activation of MYD88 and downstream pathways such as NF- κ B pathway. To better understand the role of MYD88 in B cell transformation, we introduced the mouse orthologous mutation Myd88^{L252P} in *Rosa26* locus. We first demonstrate that MYD88 transformation potential is strongly associated with a shift of B-cell peripheral differentiation toward IgM plasma cells with IgM secretion. Then, we show that the B-cell restricted expression of MYD88^{L252P} induced an oligoclonal or clonal IgM lymphoplasmacytic-like B-cell lymphoma with a serum IgM monoclonal peak. These tumors had marked transcriptomic proximities to WM. These results shed light on the reason why MYD88 continuous activation is associated not only with WM but also with all aggressive B-cell lymphomas with features of plasma cell differentiation.

Introduction

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

Despite these advances, WM pathophysiology is incompletely understood. Its treatment remains challenging and the exact role of *MYD88* mutations in the emergence of a lymphoplasmacytic B-cell clone is not known (7,8). Indeed, *MYD88* mutations are also found in 30% of activated B-cell type diffuse large B-cell lymphoma (ABC-DLBCL), more than half of primary cutaneous DLBCLs, leg type, and many DLBCLs at immune-privileged sites but not in plasma cell myelomas, even IgM types (9). It should be noted IgM expression is a surrogate marker of ABC-DLBCLs (10). Moreover, all these aggressive tumors of B-cells associated with *MYD88*, which often exhibit morphological features of plasma cell (PC) differentiation, are all associated with expression of the PC differentiation marker IRF4.

MYD88 protein is the canonical adapter for inflammatory signaling pathways to downstream members of the Toll-like receptor (TLR) and interleukin-1 receptor (IL-1) families. Forming the myddosome complex, MYD88 binds IL-1 receptors (IL-1R) or members of the TLR family to kinases of the IRAK family. Activation of IRAK molecules leads to the activation of the NF kappa B (NF- κ B) transcription factor and interferon 3 and 7 regulatory factors (IRF3 and 7). MYD88^{L265P} constitutively increases formation of the myddosome complex with downstream NF- κ B activation (3,11,12). Experimentally, MYD88^{L265P} is essential for survival of ABC-DLBCL and WM cell lines (3,11). A recent publication suggests the involvement of HOIP and LUBAC-dependent NF- κ B activation in the transformation potential of MYD88 activation in a mouse model (13). The current published mouse models with continuous MYD88 activation in the B-cell lineage develop aggressive clonal B-cell lymphomas that resemble human ABC-DLBCLs (13–15). Although discussed by Jo et al in the HOIP/LUBAC activation context, no IgM peak was reported in these models. Therefore the question of a direct role of MYD88 in the development of a lymphoplasmacytic lymphoma with monoclonal IgM secretion is still open.

Here, we present a new mouse model in which the MYD88^{L252P} protein, the murine ortholog of the human MYD88^{L265P} one, is continuously expressed in the B-cell lineage together with the Yellow Fluorescent Protein (YFP). We show that these mice first developed early expansion of CD93^{neg} IgM PCs with increase of both IgM secretion and bone marrow relocation of IgM B-cells. Moreover, these mice also had increased percentages of IgM^{high} CD138^{low} and IgM^{low} CD138^{high} cells with a CD138 expression continuum between the two cell types. Then, these mice develop an oligoclonal or clonal IgM lymphoplasmacytic-like B-cell lymphoma together with a serum IgM monoclonal peak. These tumors had marked transcriptomic proximities to WM. But they were located in the spleen and exhibited significant proliferation increase.

Despite differences between MYD88^{L252P} LP-like B-cell tumors and WM, our results demonstrate that the MYD88 transformation potential is strongly associated with a shift of B-cell peripheral differentiation toward plasma cells with IgM secretion. These results shed light on the reason why activation of MYD88 is found in most WM and in various aggressive B-cell lymphomas with IgM PC differentiation engagement such as ABC DLBCLs.

Materials and Methods

Generation of the transgenic mouse line MYD88 L252P

The transgenes (cDNA) *Myd88^{WT}-IRES-Yfp* and *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* were synthesized (Genecust, Dudelange, Luxembourg) and inserted into the pcDNA3.1 vector. Sequences of these transgenes are given in Supplementary Materials and Methods. The *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26-1 vector (16) containing a LoxP-flanked region, consisting of a stop cassette and the *Neomycin* gene (17). The transgene *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* was inserted downstream of the stop cassette. JM8 ES cells were transfected with the targeting vector according to a previously described protocol (18). Targeted ES cells were screened for homologous recombination by PCR. Genomic DNA extraction was performed with an in house protocol and consisted of gDNA precipitation with absolute ethanol. Twenty nanograms gDNA were used for each PCR (primer sequences in Supplementary Materials and Methods) using LongAmp® *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according the manufacturer's recommendations. Recombined ES cells were injected into C57BL/6J blastocysts which were transferred into foster mothers to obtain chimeric mice (MYD88^{L252P-nSTOP} mice).

Mice

Cd19^{Cre} mice (19) and mice carrying the *MYD88^{L252P}-IRES-Yfp* allele were crossed to induce the expression of the transgene in B cells (MYD88^{L252P} mice). Offspring were routinely screened by PCR using specific primers for the insertion of the transgene (Supplementary Materials and Methods). Animals were housed at 21–23°C with a 12-hour light/dark cycle. All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for

animal experimentation (French national authorization number: 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-2018041009469362 v3).

Cell transfection and nuclear factor κ B- dependent dual-luciferase reporter assay

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

Sera analyses

Serum was obtained from blood collected retro-orbitally. Specific ELISA and serum electrophoresis assay were performed as previously described (18,21).

Flow cytometry and *in vivo* proliferation assays

Bones of the two hind legs of the *Cd19^{Cre}* and *MYD88^{L252P}* mice were rinsed PBS in order to collect the bone marrow cells. Spleen cells from *Cd19^{Cre}* and *MYD88^{L252P}* were filtered through a sterile nylon membrane. Blood samples were collected intra-orbitally. Red cells were lysed by RBC Lysis Buffer (Biolegend, San Diego, CA). Cell suspensions were resuspended at 4°C in a labeling buffer (PBS, 1% BSA, 2mM EDTA) and labeled with fluorescent monoclonal conjugated-antibodies listed in Supplementary Materials and Methods. Labeled cells were analyzed using a BD Fortessa SORP flow cytometer (BD Bioscience France, Le Pont de Claix,

France). Results were analyzed using Kaluza Flow Cytometry software 1.2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

Immunohistochemistry

Five micrometer paraffin embedded tissue sections were deparaffinized as follow: slides were immersed successively 3 min in xylene 2 times, 3 min in ethanol 100% 3 times, 3 min in ethanol 95% once and 5 min in PBS 3 times. Then, slides were immersed in citrate buffer pH7 and heat 5 min 40 sec with a microwave at 800W 4 times. Image acquisition was performed with the Nanozoomer 2.0RS Hamamatsu and NDP.scan software (812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamamatsu City, 431-3196, Japan). Quantification of Ki67 nuclear labelling was performed with the imageJS and the Ki67 module: <http://imagejs.org/?http://module.imagejs.googlecode.com/git/mathbiol.chromomarkers.js&http://module.imagejs.googlecode.com/git/ki67> (22).

Gene expression profiling

A series of seven mice (three *Cd19^{Cre}* and four *MYD88^{L252P}*) was studied in parallel with bone marrow purified tumor B-cells from a series of 11 patients with *MYD88^{L265P}* WM (series 1) as well as lymph nodes from a series of 58 patients: 19 *MYD88^{WT}* chronic lymphocytic leukemia, 15 *MYD88^{L265P}* WM, 12 *MYD88^{WT}* Nodal marginal zone lymphoma, 5 *MYD88^{WT}* WM, 4 follicular lymphoma and 3 patients with follicular hyperplasia (series 2, Supplementary Tables 1 and 2). *MYD88* and *CXCR4* mutational status was determined as previously described (6). Total mRNA was extracted from whole infiltrated tissues and purified B-cells as reported (23). For humans and mice, amplification of RNAs and hybridization onto microarrays were performed on an Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array and on an Affymetrix Gene Atlas system® with the MoGene-2_1-st-v1 Affymetrix chip (Affymetrix, Santa Clara, CA)

respectively according to a protocol already described (24) (GEO accession number GSE138273). Bioinformatic analyses are detailed in Supplementary Materials and Methods.

Repertoire analysis

RNA was extracted from total spleen, and 1 μ g was used for sequencing. Transcripts were amplified by 5'RACE PCR using reverse primers hybridizing within either the membrane or secreted exon of the μ or γ genes. ProtoScript® II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used for reverse transcription and the amplicons were obtained using Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's instructions. Primers used are listed in Supplementary Materials and Methods. Illumina sequencing adapter sequences were added by primer extension, and resulting amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq sequencing system using MiSeq kit Reagent V2 500 cycles. Paired reads were merged using FLASH (25). Repertoire analysis was done using the IMGT/HighV-QUEST online tool (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest). The resulting output was parsed by in-house R script.

Results

Generation of a mouse model with insertion of the mouse mutation Myd88 L252P in Rosa26 locus.

To study the effect of MYD88 continuous activation on B-cell differentiation, we created a transgene constituted by the mutant murine cDNA sequence of *Myd88* (*Myd88^{L252P}*) which is orthologous to the human mutant sequence *MYD88^{L265P}* in frame with the Yellow Fluorescent Protein (*Yfp*) sequence and separated by an Internal Ribosome Entry Site (IRES) sequence (*Myd88^{L252P}-IRES-Yfp*) (Supplementary Figure 1A). To validate this transgene, we checked that it induced expression of both MYD88^{L252P} and YFP proteins in the A20 murine B-cell line (Supplementary Figures 1B and C) and that it was responsible for constitutive NF-κB activation (Supplementary Figure 1D). The *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26.1 vector(16) (Supplementary Figure 1E). In this construct, the insert was subcloned downstream from a *Neomycin-STOP* cassette flanked by LoxP sites. Chimeric mice were intercrossed to obtain stable germinal transmission of the *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* transgene (MYD88^{L252P-flSTOP} mice). MYD88^{L252P-flSTOP} and *Cd19^{Cre}* mice were crossed. Mice with both transgenes (MYD88^{L252P} mice) were then studied, with their age matched *Cd19^{Cre}* littermate as controls (*Cd19^{Cre}* LMC). B-cell specific expression of the transgene was found in more than 90% of B cells from blood and spleen compared to virtually no expression in the T-cell compartment (Supplementary Figure 1F). As expected and reflecting NF-κB activation, MYD88^{L252P} splenocytes over-expressed the NF-κB target gene *Tnfrsf10b* at the mRNA level (Supplementary Figure 1G).

Serum protein electrophoresis profiles segregate MYD88^{L252P} mice according to age

As a first exploratory step, a serum protein electrophoresis (SPE) was systematically performed on a series of 40 MYD88^{L252P} mice and 26 age matched *Cd19^{Cre}* LMCs. As shown in Figure 1A three SPE profiles were seen: normal, with polyclonal hyper gammaglobulinemia (hyper Ig) and with a monoclonal Ig peak. All *Cd19^{Cre}* LMCs exhibited normal SPE whatever old they were. In other words, SPE with hyper Ig or Ig peak were found only in MYD88^{L252P} mice (Figure 1A and 1B). Figure 1B shows the relationship between the age of MYD88^{L252P} mice and the SPE profile. Young MYD88^{L252P} mice (16-23 weeks) had a normal or hyper Ig SPE profile. In contrast, most mice older than 32 weeks had an Ig peak. In between these two groups, 24 to 31 weeks old mice (middle age) presented an hyper Ig or an Ig peak in 65% and 35% cases respectively (Fisher test, $p=2.10^{-4}$). ELISA quantification of serum Ig revealed that young MYD88^{L252P} mice with normal SPE exhibited a moderate IgM and IgG hyper Ig when compared to their *Cd19^{Cre}* LMC. Variations of serum IgG levels of middle aged and old MYD88^{L252P} mice were moderate when compared to their young counterpart. This was in contrast with serum IgM levels that were significantly increased in middle aged mice and even more in old mice (Figure 1C).

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

Whereas differentiation of MYD88 L252P B-cell precursors was marginally affected, bone marrow IgM plasma cell content was increased with a CD138 expression continuum.

Analysis of the bone marrow from 16 weeks old mice with normal SPE demonstrates that expression of the transgene was mainly found in CD19^{high} B-cells. Indeed, with an on/off effect, percentages of YFP positive cells (*i.e.* of LoxP rearranged cells) was directly related to the CD19 mean fluorescence intensity (Figure 2A). As shown in Figure 2B, global B-cell content was comparable to the one of *Cd19^{Cre}* LMCs. Among B-cells, proportions of MYD88^{L252P} CD19^{low} B220^{low} and CD43^{low} pro B-cells were moderately increased while those of CD19^{high} B-cells tended to be decreased. Among CD19^{high} B-cells, proportion of CD23^{neg} immature B-cells was increased while those of CD23^{pos} recirculating B-cells was reduced (Figure 2C).

Comparison of *Cd19^{Cre}* LMC and MYD88^{L252P} mice with either normal SPE or hyper Ig did not reveal any significant B-cell infiltration. But MYD88^{L252P} mice with hyper Ig had increased levels of IgM^{pos} CD19^{high} B-cells (Figure 3A and 3B). Strikingly, a CD138 expression continuum was clearly evidenced on a triple parametric B220/CD138/IgM histogram gated on CD43^{high} mature B-cells and/or PCs in MYD88^{L252P} mice only (Figure 3A, lower panel see in red the decrease of B220 and the increase of CD138 expression). This CD138 expression continuum, that we recently showed as a characteristics of MYD88^{L265P} WM bone marrow tumor B-cells (Gayet et al, in revision), started from IgM^{high} CD138^{low} and ended to IgM^{low} CD138^{high} cells (Figure 3A, lower panel). This CD138 expression continuum was absent in *Cd19^{Cre}* LMCs. Consequently, MYD88^{L252P} mice showed increased percentages of both IgM^{high} CD138^{low} B-cells (likely to be the precursors of IgM PCs) and total bone marrow PCs (Figure 3B). Moreover, the proportion of bone marrow IgM PCs was significantly increased in MYD88^{L252P} mice with normal SPE and even more with hyper Ig (Figure 3C).

Altogether, these results indicate that expression of the transgene started in the minority of pro B cells and was mainly expressed at the latest stages of B-cell lymphopoiesis when CD19

expression was high. As a consequence, differentiation of bone marrow B-cell precursors was slightly shifted toward moderate expansion of B-cell progenitors but without any B-cell differentiation blockade. Second, evidences for bone marrow increase of both IgM^{high} CD138^{low} and PCs with the characteristic CD138 expression continuum may either suggests that the bone marrow of MYD88^{L252P} mice had the ability to home IgM PC precursors and PCs and/or a shift of peripheral B-cell differentiation toward IgM PC in MYD88^{L252P} mice.

MYD88^{L252P} first induced peripheral early lymphoplasmacytic and plasma cells expansion and then B-cell transformation into a lymphoplasmacytic-like lymphoma

Young MYD88^{L252P} mice with normal SPE tended to have spleen enlargement when compared to their age related *Cd19^{Cre}* LMCs (Figure 4). Spleen enlargement was dramatically increased in MYD88^{L252P} mice with hyper Ig and even more in those with an IgM peak, a feature that was likely to be related to B-cell transformation. Indeed, the B/T cell ratio was markedly increased in these latter mice (Supplementary Figure 2).

While spleen histology of young MYD88^{L252P} mice was comparable to that of their *Cd19^{Cre}* LMCs, with an apparent normal spleen architecture, MYD88^{L252P} mice with hyper Ig or with an Ig peak exhibited enlarged and congruent lymphoid nodules (Figure 5A-E). At high magnification, a marked lymphoplasmacytic aspect consisting in a mixture of small to large lymphocytes with numerous lymphoplasmacytic cells (LP cells) and PCs was noted in all MYD88^{L252P} mice whatever their SPE profile (Figure 5F-J). This morphological aspect clearly evokes a lymphoplasmacytic like lymphoma (LP-like) in MYD88^{L252P} mice with an Ig peak (see also the cytological imprint in Supplementary Figure 3). Presence of LP cells and PCs in MYD88^{L252P} spleen was invariably confirmed by immunohistochemistry after intracellular Ig labeling whatever the SPE status, with numerous LP cells and terminally differentiated PCs (cells with intermediate or strong intracytoplasmic Ig labeling respectively). Noteworthy,

densities of these cells were markedly increased in MYD88^{L252P} mice with hyper Ig or with an Ig peak (Figure 5K-O).

Based on B-cell expression of CD21 and CD23 by flow cytometry, it was found that frequencies of CD21^{pos} CD23^{high} follicular B-cells was not significantly altered in MYD88^{L252P} mice whatever their SPE status (Figure 6A). In contrast, a decrease of CD21^{high} CD23^{pos} marginal zone B-cells was seen. This cell content nearly disappeared in MYD88^{L252P} mice with an Ig peak. Proportion of total PCs was increased only in these mice (Figure 6B). But among total spleen PCs, percentages of IgM PCs were increased in a similar manner in all MYD88^{L252P} mice whatever their SPE status (Figure 6C). Moreover, the IgM PCs were predominantly CD93^{neg} suggesting that belonged to the proliferating PC compartment (26) (Figure 6C).

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

Proliferation index of MYD88^{L252P} LP-like tumors was moderately increased in MYD88^{L252P} tumors with an LP-aspect.

To better investigate these MYD88^{L252P} LP-like tumors, we compared their Ki67 proliferation index to that their of *Cd19^{Cre}* LMCs as well as to L.CD40, L.CD40/*λc-MYC* mice as controls. L.CD40 mice are a model of marginal zone spleen B cell indolent lymphoma without any plasma cell differentiation but with NF-κB activation (27). L.CD40/*λc-MYC* mice are a model of ABC-DLBCLs with both c-Myc and NF-κB activation in B-cells of the latter (23). Very few Ki67 positive cells were seen on spleen sections from *Cd19^{Cre}* mice outside germinal centers

(Figure 7A panel A). Ki67 index was weak in L.CD40 mice (Figure 7A panel B). By contrast, the vast majority of cells from L.CD40/ λ c-MYC tumors were Ki67 positive (Figure 7A panel C). Being moderately increased in young mice with normal SPE, Ki67 proliferative index was further enhanced in mice with hyper Ig and even higher in those with an Ig peak, but never reached proliferation index levels of L.CD40/ λ c-MYC tumors (Figure 7A panels D to F and 7G). *In vivo* incorporation of BrdU was tested for four mice with an Ig peak and one with polyclonal hyper Ig. Results confirmed that the proliferation index was constantly increased (Supplementary Figure 4) albeit always below 30% with this technique.

Altogether, these results show that expression of MYD88^{L252P} in B-cells was responsible for progressive peripheral B-cell expansion related to early increase of B-cell proliferation capacities. Mice with an Ig peak clearly exhibited a lymphoproliferative disease with marked increase in proliferation index but with features of an LP-like lymphoma such as presence of numerous LP cells and PCs.

MYD88^{L252P} mice with Ig peak developed IgM but not IgG monoclonal B-cell lymphoma with expression of both membrane and secretory heavy chain mRNA.

Since MYD88^{L252P} mice had a global hyper Ig even if predominant on IgM, it was important to assess the clonality of the surface and secreted immunoglobulin of the tumors according to the μ or γ chain at the molecular level. Six LP-like cases with monoclonal Ig peak and five *Cd19^{Cre}* mice were studied. A mRNA reverse transcription followed by RACE PCR with primers specific for either the membrane or the secreted form of mouse μ or γ heavy chain was performed, followed by high throughput sequencing (HTS) of the VDJ-C μ or VDJ-C γ region (Figure 8A). Figures 8B and 8C show the relative frequency of the five most abundant mRNA clones for the μ or the γ heavy chain respectively. RACE PCR and HTS results indicate that

MYD88^{L252P} mice developed clonal or oligoclonal B-cell expansion with expression of both secreted and membrane forms of the μ heavy chain that had the same VDJ-C μ clonal rearrangement (Figure 8B), without any bias in terms of V segment usage (not shown). The same RACE PCR technique with primers specific for either the membrane or the secreted form of the mouse γ heavy chain did not identify any significant B-cell clonal expansion in MYD88^{L252P} tumors (Figure 8C).

These results indicate that, despite initial IgM and IgG hyper Ig in young MYD88^{L252P} mice, MYD88^{L252P} specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with clonal expression of both membrane and secreted μ chain isoforms with the very same VDJ gene rearrangement. These results are in full agreement with the lymphoplasmacytic aspect MYD88^{L252P} tumors and the persistent IgM plasma cell differentiation continuum

Transcriptomic signature of MYD88^{L252P} LP-like tumors point on NF- κ B RelA activation, proliferation and plasma cell differentiation and overlapped with Waldenström's Macroglobulinemia gene expression profile.

To explore the transcriptomic signature of MYD88^{L252P} LP-like tumors in similar conditions as those of most studies on human B-cell lymphomas and to search for common features with WM, we select a short series of massively invaded MYD88^{L252P} spleen tumors with monoclonal Ig peak. Comparison was first done with their *Cd19^{Cre}* LMCs, and then with WM patients.

With a fold change of 2, a set of 1515 differentially expressed genes were found in MYD88^{L252P} spleen tumors when compared to spleen of *Cd19^{Cre}* LMCs (Supplementary Table 3). To analyze this set of genes, we combined both K-mean and hierarchical clustering and principal component analysis, as already published (28). Following this methodology, deregulated genes

in MYD88^{L252P} spleen tumors could be segmented in 14 classes of co-regulated genes (Figure 9 with methodological details in Supplementary Materials and Methods, Supplementary Figure 5 and Supplementary Table 4). Consistently with increased B/T ratios in MYD88^{L252P} LP-like tumors, expression of genes belonging to the T-cell lineage, as well as T-cell signaling and activation signatures were down-regulated in MYD88^{L252P} spleen tumors (Figure 9, see clusters I, K and L). Of note, RelB signature was associated with that of T-cells and was decreased in MYD88^{L252P} spleen tumors. At the opposite, expression of genes belonging to the proliferation, *RelA* NF-κB activation pathway and plasma cell differentiation signatures were up-regulated (Figure 9, cluster J mainly as well as cluster B, G and M for proliferation).

To search for MYD88^{L252P} deregulated genes in common with those of WM patients with the *MYD88^{L265P}* mutation, transcriptome of MYD88^{L252P} tumors was compared to one of purified WM bone marrow B-cells from a series of 11 WM patients with the *MYD88^{L265P}*. A subset of 319 coherently dysregulated genes in both MYD88^{L252P} LP-like tumors and WM tumor B-cells (163 up and 156 down, Supplementary Tables 5 and 6) was extracted from the 1515 differentially expressed genes in MYD88^{L252P} LP-like tumors. Unsupervised hierarchical clustering showed a 95% coherency between the branches of up and down regulated genes in both WM tumor B-cells and LP-like MYD88^{L252P} spleen tumors (Figure 10A, left and middle panels and Supplementary Tables 5 and 6). To check whether this MYD88^{L252P}/WM signature could discriminate WM from other indolent NHLs, an independent series of 58 patients, including 15 *MYD88^{L265P}* WM, five *MYD88^{WT}* WM, 12 *MYD88^{WT}* NMZLs and 19 *MYD88^{WT}* CLL was analyzed (Supplementary Tables 2 and 7). All *MYD88^{L265P}* WM patients clustered together after unsupervised hierarchical clustering (Figure 10A, right panel and Supplementary Tables 7 and 8). Belonging also to the *MYD88^{L265P}* WM cluster were 3/5 (60%) *MYD88^{WT}* WM and 2/12 (17%) *MYD88^{WT}* NMZLs. We used the linear predicting score described by Wright et al (29) to estimate the informativeness of the MYD88^{L252P}/WM signature for WM diagnosis.

As shown in Figure 10B, a set of 174 genes (84 up and 90 down, Figure 10B) was found to predict WM with a probability over 90% (Supplementary Tables 9 and 10).

The plasma cell signature was the main component of the MYD88^{L252P}/WM GEP. Genes such as *EDEMI* and 2, *IRF4* or *XBPI* were over-expressed while others such as *PAX5* or *BCL6* were markedly down-regulated (Figure 10). Consistently, functions revealed by the Gene Set Enrichment analysis mainly corresponded to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (not shown). In accordance with results published by Hunter et al (30), expression of genes such as *CXCR4*, *DUSP22*, *PIMI* and 2 or *TRAMI* was increased while expression of *SNEDI* was decreased. Few genes of the MYD88^{L252P}/WM signature overlapped with those of ABC/GC DLBCLs published by Wright et al (29). These overlapping genes, corresponding only to those that are overexpressed in ABC DLBCLs, were *IRF4*, *IGHM*, *CXCR4*, *P2RX5*, *PIMI* and *PIM2*. In other words, the MYD88^{L252P}/WM signature did not significantly overlap with that of GCB DLBCLs. Among other deregulated genes were cyclin kinase inhibitors *CDKN1B* (*p27^{kip1}*) and *CDKN2C* (*p18/INK4AC*), mutations of the former being found in hairy cell leukemia (31). *RASSF3* and *KRAS* were also up-regulated. *RASSF3* belongs to the Ras association domain family (RASSF).

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

Discussion

Different mouse preclinical models with continuous activation of MYD88 in B-cell have been published, all demonstrating the B-cell transformation potential of MYD88 but without presenting evidences for a relationship with IgM B-cell LP and PC differentiation. (13–15). The first report was published by Knittel et al. (14). The authors generated a mouse model that allows for B-cell conditional expression of the *Myd88*^{L252P} allele from the endogenous *Myd88* locus. In this model, expression of *Myd88*^{L252P} would be regulated in a similar manner to the one of the wild type allele. At least three regulatory levels of MYD88 activity have been reported. The MYD88 regulatory region harbors various transcription binding sites such as those for NF-κB, IRF1, SP1 or STAT factors and showed that this gene is regulated by IL-6 (32), which suggests a role of its expression in either plasma cell differentiation or inflammation. An alternative splice variant of *MYD88*, *MYD88s*, lacks exon 2 and is unable to activate NF-κB. This variant is also able to form a heterodimer with the full length MYD88 protein, resulting in decreased formation of the myddosome complex (33). Being increased during sepsis, MYD88s is thought to ensure robust termination of MYD88 dependent inflammation (34,35). As a third regulation mechanism, hypomethylation and upregulation of MYD88 are important for NF-κB activation (36). MYD88 promoter demethylation is important in glioblastoma and is associated with increased MYD88 protein expression in lung cancers (37,38). Mice of the Knittel's model occasionally developed DLBCLs when aged. Therefore, the Knittel mouse model raises the question of the relationship between B-cell lymphomagenesis and regulation of the endogenous *Myd88* locus throughout B-cell life. But, this model also exhibit hyper Ig, even if polyclonal, which may suggests that expansion of Ig secreting B-cells could precede the lymphoma development.

To our knowledge, two papers, from Wang et al and Sewastianik et al reported on the effect of the human MYD88^{L265P} protein in murine B-cells (39,15). In the model of Wang et al, primary murine B-cells were retrovirally infected *ex vivo* before reinjection. In this model, an initial boost of B-cell proliferation was seen followed by B-cell apoptosis in a Bim-dependent manner. Importantly, no increase in immunoglobulin secretion was reported in this paper. Beside the fact that retroviral infection of B-cells may have its own interfering effects, this model raises the question whether the human MYD88^{L265P} protein may have exactly the same activation properties on a mouse B-cell background as in human B-lymphocytes. In the model of Sewastianik et al, the human loxP-flanked-stop-MYD88^{L265P} transgene was inserted downstream from the mouse *Collagen type I alpha 1 chain (Col1A1)* gene and MYD88^{L265P} expression was induced by crossing with the *Aid^{Cre}* mice (15). In addition to focal skin rashes, some WM features were reported such as expansion of lymphoplasmacytic cells and increased IgM serum levels. However, only DLBCL clonal transformation was seen. Because AID is mainly expressed in germinal center B-cells and because the promoter of the *Col1A1* gene is highly active in fibroblasts and osteoblasts (40), this model raises the question whether temporality and/or expression pattern could be important in MYD88 driven B-cell lymphomagenesis.

The *Rosa26* locus has been solidly proven to be valuable for expression of numerous oncogenes in the B-cell lineage (see reference (41) for discussion as well as the literature of the K Rajewsky's group). By inserting our *Myd88^{L252P}-IRES-Yfp* transgene in this locus, we enforced continuous expression of the mutated MYD88 protein in a heterozygous-like context while respecting the native MYD88 activation pathways of mouse B-cells. Moreover, we were able to monitor our transgene expression by flow cytometry due to YFP. Thereby, we created a conditional MYD88^{L252P} mouse model closed to the one published by Jo et al (13). But these

authors mainly focused their work on the synergy between MYD88 and the catalytic subunit HOIP which increases LUBAC ligase activity that in turns promotes NF- κ B canonical activation and only four so-called CD19-cre-MYD88LP have been studied at the tumor stage.

Here, longitudinal analysis of a series of 40 MYD88^{L252P} mice compared to their age matched *Cd19^{Cre}* LMCs allowed to demonstrate that IgM plasma cell expansion is at the heart of MYD88 dependent B-cell transformation. Indeed, pointing on clonal restriction of IgM secreting B-cells, we first show that ageing of MYD88^{L252P} mice was associated with polyclonal hyper Ig followed by monoclonal Ig peak due to IgM serum increase. Second, we present evidences indicating that bone marrow relocalization of IgM B-cells, IgM^{high} CD138^{low} cells and IgM PCs was increased in MYD88^{L252P} mice with a CD138 expression continuum, that is a characteristics of WM tumor B-cells. Third, analysis of spleen morphology and spleen B-cell subsets by flow cytometry indicates that continuous activation of MYD88 was very early associated with peripheral LP cell and CD93^{neg} IgM PC expansion and that these cell subsets were markedly increased at the time of the Ig monoclonal peak. Fourth, appearance of a monoclonal Ig peak was constantly associated with a B-cell lymphoma with marked features of lymphoplasmacytic differentiation, so-called MYD88^{L252P} LP-like lymphoma. Fifth, at the molecular level, MYD88^{L252P} specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with mRNA clonal expression of both membrane and secreted μ (but not γ) chain isoforms. Finally, the MYD88^{L252P} tumor gene expression profile not only points on the canonical NF- κ B p65/RelA activation pathway and the proliferation, but also and strikingly shares with MYD88^{L265P} WM an *Xbp1* centered lymphoplasmacytic B-cell differentiation signature, that signature allowing to differentiate MYD88^{L265P} WM from other indolent B-cell tumors including marginal zone lymphomas.

To establish the gene expression signature from bulk MYD88^{L265P} spleen tumors rather than from purified B-cells is matter of discussion. The very well-known disadvantage of working on bulk tumors is certainly that all mRNA species from all the cell types present in the tissue are mixed together. Even if massively invaded, both stromal and other residual immune cells (T-cells, macrophages, dendritic cells...) are constantly persisting in the tumor. In these conditions, to specifically ascribe a given mRNA expression pattern to tumor cells is always hazardous. But, because the tumors were immediately snap-frozen, all the mRNA species are supposed to be well preserved without any significant experimental bias. On the other hand, working on purified cells may also induce artefacts since abundance of the different mRNA species may differently vary during the time of purification by itself, that can also stress the cell. Above all, in the specific case of MYD88^{L265P} spleen tumors, which exhibit an LP aspect with continuous PC differentiation, the key question would have been to choose the right negative selection marker. Indeed, tumor cells are phenotypically heterogeneous with variable expression of B220, surface Ig or CD138 for example. Should we had to select B220^{high} versus B220^{low} B-cells or CD138^{low} versus CD138^{high} cells ? Rather to make wrong or partial choice of which tumor cell to purify, we chose to work on bulk MYD88^{L265P} spleen tumors with all well preserved mRNA species and to compare this bulk signature to the one of WM, including purified WM bone marrow BM cells.

Gene expression profile of LP-like MYD88^{L252P} tumors clearly suggests the involvement of RelA rather than RelB. RelA, but not RelB, is clearly associated with EBV-dependent B-cell immortalization and with EBV-associated DLBCL tumors, which exhibit a phenotype closed to the one of ABC-DLBCLs (24). RelA is also essential for development of GC-derived PCs

(42) and immunohistochemistry detection of nuclear RelA has been reported in WM B-cells (43). Indeed, LP-like MYD88^{L252P} B-cell tumors shared strong overlaps with human WM in terms of gene expression profile. Even if a few genes were in common with the ABC-DBCL signature such as *IGHM*, *CXCR4* or *PIMI* and *PIM2*, the MYD88^{L252P}/WM signature points to the dysregulation of plasma cell differentiation as the keystone of MYD88 transforming physiopathology. It also suggests that *KRAS* activation could be important. Indeed *RASSF3* and *KRAS* itself were up-regulated in both MYD88^{L252P} B-cell tumors and human WM. Consistently, and in agreement with results from the group of Treon (30), we also found *RASSF6* overexpression in WM patients (NG and JF unpublished results). *CXCR4*, whose expression is increased in WM, may activate the RAS pathway through RasGAP-associated proteins (44). The most frequent mutations involve *KRAS* and *NRAS* genes in multiple myeloma (45). Even if such mutations have not been reported in WM (6), our results highlight the putative role of the Ras activating pathway in WM, which may lead to the design of novel therapies.

Despite similarities between WM and MYD88^{L252P} LP-like tumors such as serum Ig monoclonal peak, increase of IgM prePCs and PC bone marrow relocation and marked lymphoplasmacytic differentiation of tumor cells some major differences exist. As a first difference, is the predominant site of tumor involvement. Even if splenomegaly is found in 20% of bona fide WM patients, it is largely admitted that bone marrow is the primary tumor site in this cancer. In contrast, MYD88^{L252P} LP-like mouse tumors mainly developed in the spleen. Physiologically, IgM PCs mainly tend to reside in the spleen whereas switched IgG PCs migrate to the bone marrow (46). This raise the question of why WM IgM tumor B-cells migrate to bone marrow. In that view, it is largely suspected that mutation of *CXCR4* could play a role in the bone marrow homing.

Another significant difference is the presence of large cells and the increased proliferation in MYD88^{L252P} LP-like mouse tumors. Increased proliferation index was an early event since it was also found in young MYD88^{L252P} mice with normal SPE. As we previously discussed(23), only three mouse models for indolent lymphomas of the spleen have been published, one mimicking TRAF3 inactivation, the second with constitutive expression of BCL10 and the last one with continuous CD40 signaling (the L.CD40 model that we used as control in figure 7) (27,47,48). These three models are characterized by an increased activation of RelB. We previously demonstrated that the immune surveillance may influence the morphology and the proliferation in the L.CD40 model. In this model, immunosuppression led to transformation of small B-cell indolent L.CD40 tumors into large B-cell with increased proliferation while reactivating the anti-tumor response thanks to anti-PD-L1 immunotherapy led to regression of the tumor (49,50). These results on this mouse model suggests the immunologically silent “indolent phenotype” of a B-cell tumor could be related to the immune pressure exerted on the tumor B-cell. Whether and how the activation of the alternative and canonical NF-κB differently disturb the immune surveillance remains to determine, and comparison of both L.CD40 and MYD88^{L252P} mouse models could bring some answers. But, like in the L.CD40 tumor model and in spleen marginal zone lymphomas (50,51), the PD1/PD-L1 axis is very likely to play a role in the immune escape of aggressive tumor B-cells with MYD88 activation. Indeed, using Eμ-*MYC* transgenic hematopoietic stem cells (HSC) stably transduced with naturally occurring NF-κB mutants to generate various primary mouse lymphomas, Reimann et al recently showed that MYD88 tumors express high levels of PD-L1 and that anti-PD-1 therapies induces T-cell dependent senescence of tumor cells (52). PD-L1 surface expression is weak or absent on WM tumor B-cells. But levels of serum soluble PD-L1 levels are increased in WM patients and PD-L1 is upregulated by IL6 (53).

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

Acknowledgements

The group of J Feuillard is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the France Lymphome Espoir association, the Nouvelle Aquitaine Region and the Haute-Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer. CVF was supported by the France Lymphome Espoir association of patients. SP is supported by the Septentrion committee of Ligue contre le Cancer.. ME is supported by an ANR @RAction grant (ANR-14-ACHN-0008), an ANR JCJC grant (ANR-19-CE15-0019-01), an IDEX Université de Paris grant, a Fondation Arthritis grant and a Fondation ARC grant (P JA20181208173). KB is supported by an ANR PRC grant (ANR-17-CE14-0019), an INCa grant (PRT-K 2017) and the Association Saint Louis pour la Recherche sur les Leucémies. We thank the animal, histology and cytometry facilities of the BISCEm US 42 INSERM / UMS 2015 CNRS technological platform of the University of Limoges as well as the immunology laboratory of the Limoges University

Hospital Center for their technical assistance. We thank Dr Jeanne Cook Moreau (UMR CNRS 7276/INSERM 1276) for careful English editing.

Authorship Contributions

C.O.¹ and L.R. contributed equally to this work. C.O.¹ and L.R. performed and analyzed experiments. A.S. helped to perform the repertoire analysis. C.O.² performed and analyzed ELISA. M.D. and N.G. performed the transcriptomic experiments. J.F., S.P., A.S. and L.R. performed the bioinformatics analyses. N.F. participated in the design of the project. K.B and M.E. participated to the development of this study. C.V.F. created the mouse model, contributed to the experiments and analyzed the results. J.F and C.V.F. directed the study and wrote the manuscript. All author read and approved the final manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

None

References

1. Preud'homme JL, Seligmann M. Immunoglobulins on the surface of lymphoid cells in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Invest.* mars 1972;51(3):701-5.
2. Ghobrial IM. Are you sure this is Waldenström macroglobulinemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:586-94.
3. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 30 août 2012;367(9):826-33.
4. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia.* janv 2013;27(1):183-9.
5. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* août 2013;27(8):1722-8.
6. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2016;22(6):1480-8.
7. Baron M, Simon L, Poulain S, Leblond V. How Recent Advances in Biology of Waldenström's Macroglobulinemia May Affect Therapy Strategy. *Curr Oncol Rep.* 26 févr 2019;21(3):27.
8. Leblond V, Kastiris E, Advani R, Ansell SM, Buske C, Castillo JJ, et al. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood.* 08 2016;128(10):1321-8.
9. Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP. Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms. *Mod Pathol.* 2017;30(10):1338-66.
10. Ruminy P, Etancelin P, Couronné L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* avr 2011;25(4):681-8.
11. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 3 févr 2011;470(7332):115-9.
12. de Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica.* déc 2019;104(12):2337-48.
13. Jo T, Nishikori M, Kogure Y, Arima H, Sasaki K, Sasaki Y, et al. LUBAC accelerates B-cell lymphomagenesis by conferring resistance to genotoxic stress on B cells. *Blood.* 6 août 2020;136(6):684-97.
14. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood.* 02 2016;127(22):2732-41.

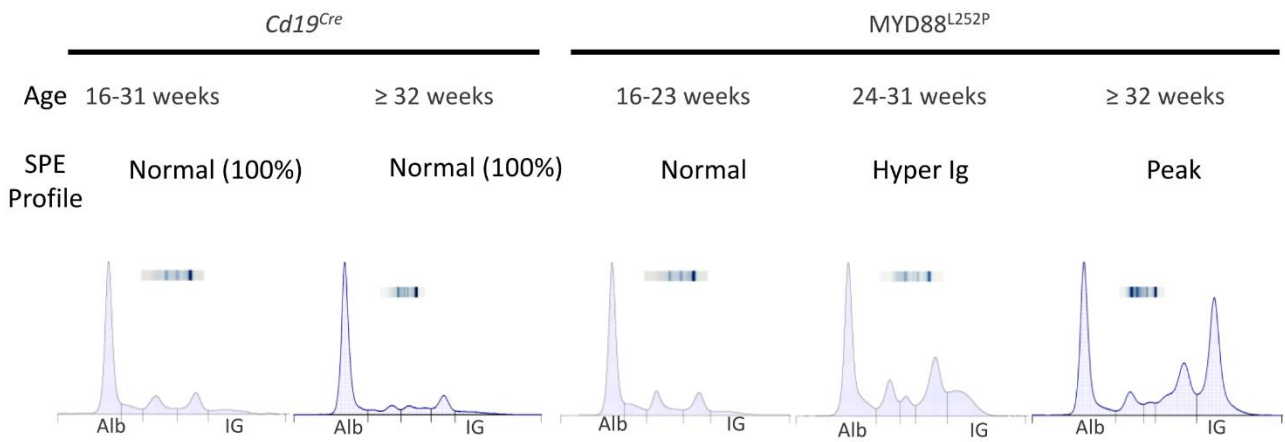
15. Sewastianik T, Guerrero ML, Adler K, Dennis PS, Wright K, Shanmugam V, et al. Human MYD88L265P is insufficient by itself to drive neoplastic transformation in mature mouse B cells. *Blood Adv.* 12 nov 2019;3(21):3360-74.
16. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* janv 1999;21(1):70-1.
17. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 juill 1992;89(14):6232-6.
18. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, et al. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 16 sept 2010;116(11):1895-8.
19. Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 15 mars 1997;25(6):1317-8.
20. Faumont N, Chanut A, Benard A, Cogne N, Delsol G, Feuillard J, et al. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica.* mars 2009;94(3):355-63.
21. Chauzeix J, Laforêt M-P, Deveza M, Crowther L, Marcellaud E, Derouault P, et al. Normal serum protein electrophoresis and mutated IGHV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Med.* 2018;7(6):2621-8.
22. Almeida JS, Iriabho EE, Gorrepati VL, Wilkinson SR, Grüneberg A, Robbins DE, et al. ImageJS: Personalized, participated, pervasive, and reproducible image bioinformatics in the web browser. *J Pathol Inform.* 2012;3:25.
23. David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, et al. c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor-κB activated B cells. *Haematologica.* 2017;102(5):883-94.
24. Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, et al. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia.* avr 2014;28(4):871-9.
25. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 1 nov 2011;27(21):2957-63.
26. Chevrier S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, et al. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 mars 2009;106(10):3895-900.
27. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Müller W, et al. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med.* 9 juin 2008;205(6):1317-29.
28. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, Grömminger S, Schuhmacher M, Hölzel M, et al. c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol.* mai 2009;83(10):5014-27.

29. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 août 2003;100(17):9991-6.
30. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N, Vos JM, Liu X, et al. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 11 2016;128(6):827-38.
31. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM, et al. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. *Blood*. 05 2017;130(14):1644-8.
32. Harroch S, Gothelf Y, Revel M, Chebath J. 5' upstream sequences of MyD88, an IL-6 primary response gene in M1 cells: detection of functional IRF-1 and Stat factors binding sites. *Nucleic Acids Res*. 11 sept 1995;23(17):3539-46.
33. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol*. 19 mars 2002;12(6):467-71.
34. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon J-M. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med*. sept 2006;34(9):2377-85.
35. Lee FF-Y, Davidson K, Harris C, McClendon J, Janssen WJ, Alper S. NFkB mediates lipopolysaccharide-induced alternative pre-mRNA splicing of MyD88 in mouse macrophages. *J Biol Chem*. 16 mars 2020;
36. Meng R, Li D, Feng Z, Xu Q. MyD88 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with LTA-induced inflammatory response in human odontoblast-like cells. *Cell Tissue Res*. juin 2019;376(3):413-23.
37. Šutić M, Motzek A, Bubanović G, Linke M, Sabol I, Vugrek O, et al. Promoter methylation status of ASC/TMS1/PYCARD is associated with decreased overall survival and TNM status in patients with early stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res*. déc 2019;8(6):1000-15.
38. Wang W, Zhao Z, Wu F, Wang H, Wang J, Lan Q, et al. Bioinformatic analysis of gene expression and methylation regulation in glioblastoma. *J Neurooncol*. févr 2018;136(3):495-503.
39. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med*. 10 mars 2014;211(3):413-26.
40. Komori T. Mouse models for the evaluation of osteocyte functions. *J Bone Metab*. févr 2014;21(1):55-60.
41. Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol*. juill 2007;8(7):665-8.
42. Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-κB transcription factor subunits. *J Exp Med*. 22 sept 2014;211(10):2103-18.

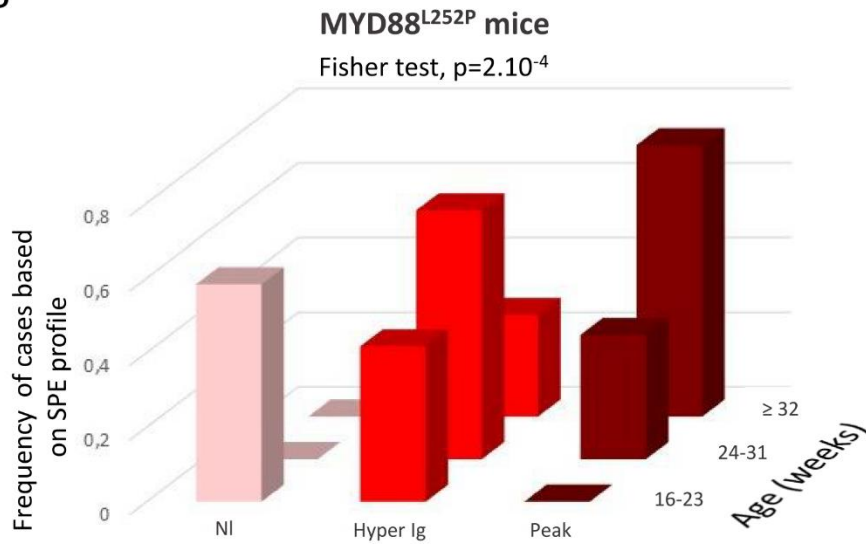
43. Merzianu M, Jiang L, Lin P, Wang X, Weber DM, Vadhan-Raj S, et al. Nuclear BCL-10 expression is common in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia and does not correlate with p65 NF-kappaB activation. *Mod Pathol.* juill 2006;19(7):891-8.
44. Okabe S, Fukuda S, Kim Y-J, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood.* 15 janv 2005;105(2):474-80.
45. Perrot A, Corre J, Avet-Loiseau H. Risk Stratification and Targets in Multiple Myeloma: From Genomics to the Bedside. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 23 mai 2018;38:675-80.
46. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Corrigendum: Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat Commun.* 16 2016;7:12687.
47. Li Z, Wang H, Xue L, Shin D-M, Roopenian D, Xu W, et al. Emu-BCL10 mice exhibit constitutive activation of both canonical and noncanonical NF-kappaB pathways generating marginal zone (MZ) B-cell expansion as a precursor to splenic MZ lymphoma. *Blood.* 5 nov 2009;114(19):4158-68.
48. Moore CR, Liu Y, Shao C, Covey LR, Morse HC, Xie P. Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice. *Leukemia.* mai 2012;26(5):1122-7.
49. Vincent-Fabert C, Saintamand A, David A, Alizadeh M, Boyer F, Arnaud N, et al. Reproducing indolent B-cell lymphoma transformation with T-cell immunosuppression in LMP1/CD40-expressing mice. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(4):412-4.
50. Vincent-Fabert C, Roland L, Zimmer-Strobl U, Feuillard J, Faumont N. Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF-kB, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma. *Cell Commun Signal.* 05 2019;17(1):89.
51. Vincent-Fabert C, Soubeyran I, Velasco V, Parrens M, Jeannet R, Lereclus E, et al. Inflamed phenotype of splenic marginal zone B-cell lymphomas with expression of PD-L1 by intratumoral monocytes/macrophages and dendritic cells. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(6):621-4.
52. Reimann M, Schrezenmeier JF, Richter-Pechanska P, Dolnik A, Hick TP, Schleich K, et al. Adaptive T-cell immunity controls senescence-prone MyD88- or CARD11-mutant B-cell lymphomas. *Blood.* 24 nov 2020.
53. Jalali S, Price-Troska T, Paludo J, Villasboas J, Kim H-J, Yang Z-Z, et al. Soluble PD-1 ligands regulate T-cell function in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood Adv.* 14 2018;2(15):1985-97.

Figure 1

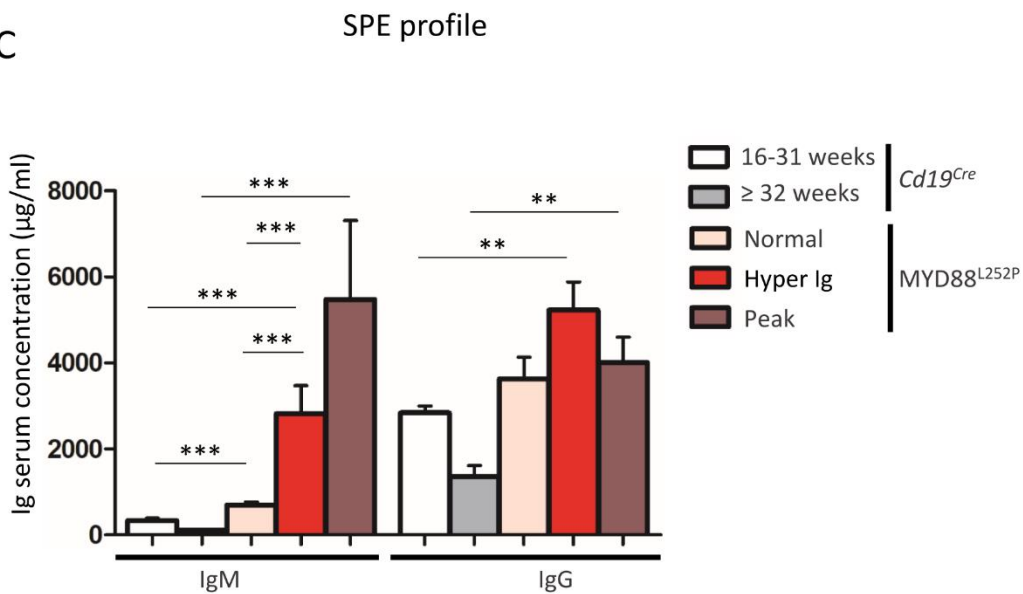
A



B



C



Legends for figures

Figure 1: MYD88^{L252P} transgenic mice exhibited serum IgM hypergammaglobulinemia and then monoclonal IgM peak when ageing.

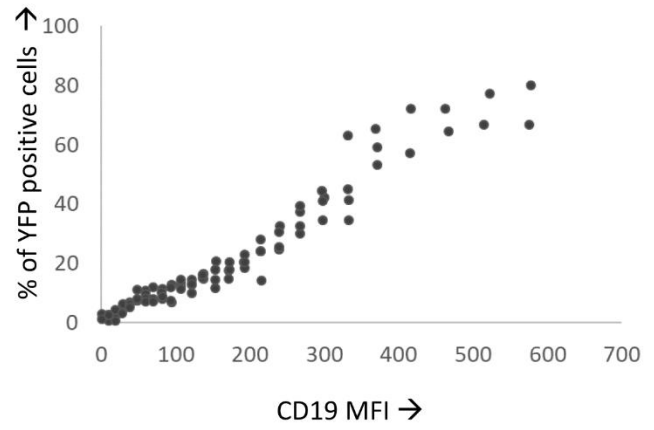
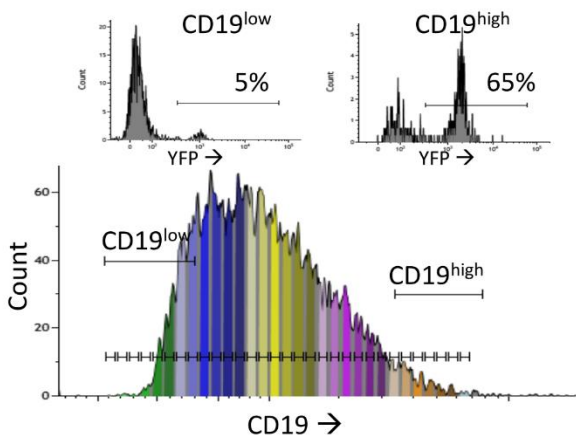
Figures 1A: examples of serum protein electrophoresis of *Cd19^{Cre}* mice (respectively 16 and 36 weeks-old) and three MYD88^{L252P} mice at 16, 24 and 36 weeks-old with normal, polyclonal hypergammaglobulinemia (hyper Ig) and monoclonal Ig peak respectively.

Figures 1B: Frequencies of cases according to the SPE profile and the age for MYD88^{L252P} mice (n=40).

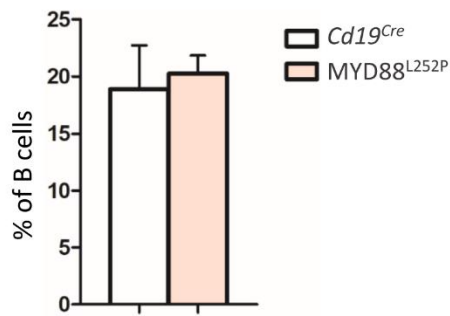
Figure 1C: IgM and IgG serum levels in *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} mice. For *Cd19^{Cre}* (n=15), MYD88^{L252P} (n=36). Results are expressed as the mean \pm SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and < 0.001 are symbolized by ** and *** respectively.

Figure 2

A



B



C

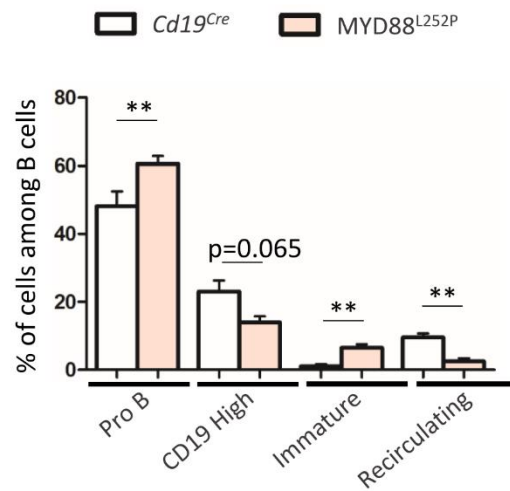


Figure 2: Analysis of B-cell differentiation in bone marrow of 16 weeks-old *Cd19^{Cre}* and *MYD88^{L252P}* mice.

Figure 2A: Analysis by flow cytometry of the expression of the transgene according to the CD19 expression levels (n=9).

Left panel: example of CD19 monoparametric histogram sliced according to CD19 MFI's intervals. For each CD19 MFI interval, the percentage of bone marrow B220^{pos} YFP positive cells was noted. Two examples of YFP monoparametric histogram are presented in the upper part, one for CD19^{low} B220^{pos} B-cells and one for CD19^{high} B220^{pos} B-cells with their respective percentages of YFP^{pos} cells

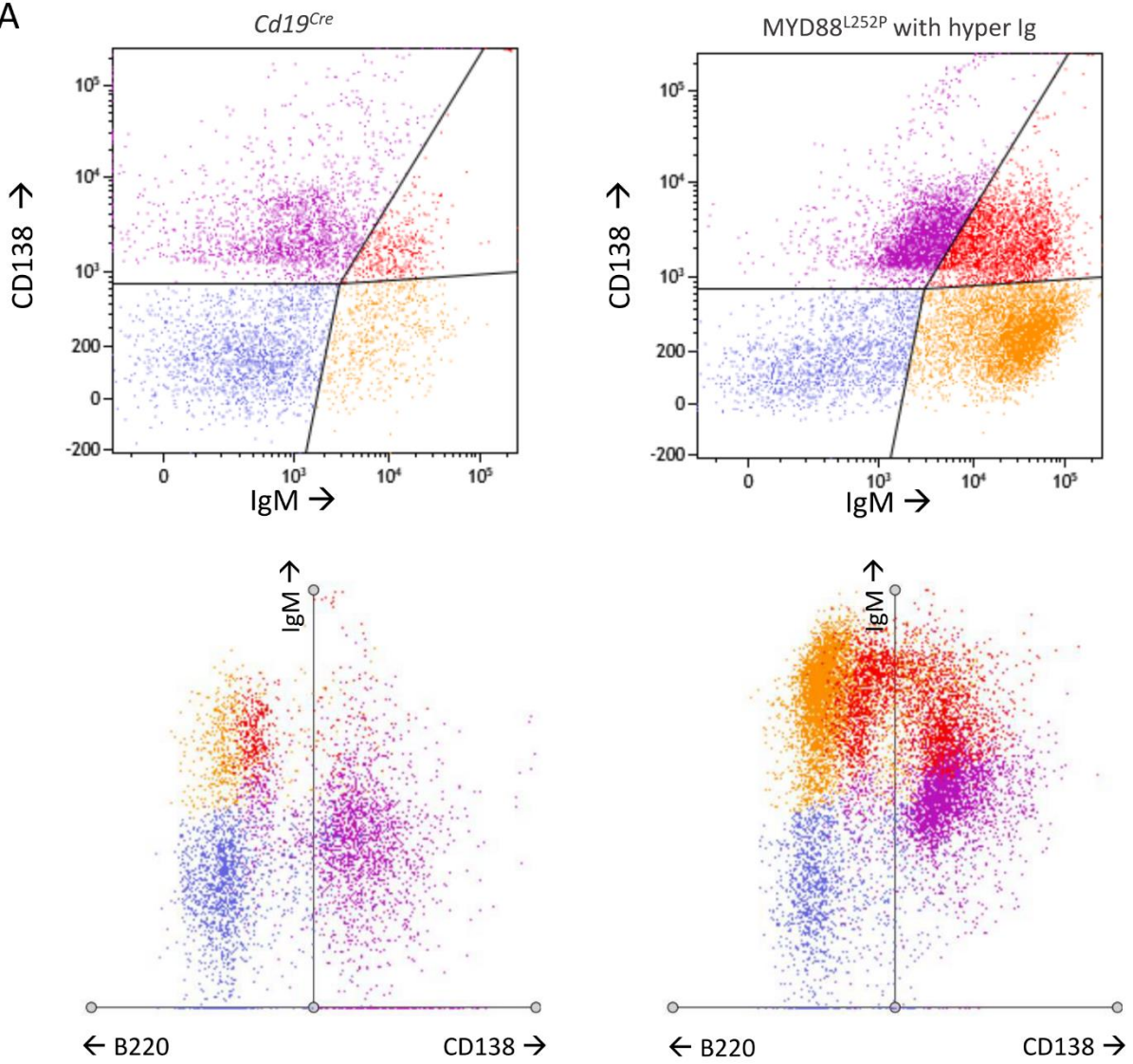
Right panel: percentage of YFP^{pos} B220^{pos} B-cells (Y axis) according to CD19 MFI (X axis)

Figure 2B: Percentage of CD19^{pos} and/or B220^{pos} B-cells in the bone marrow of 16 weeks-old *Cd19^{Cre}* (n=9) and *MYD88^{L252P}* mice (n=9). Results are expressed as the mean \pm SEM.

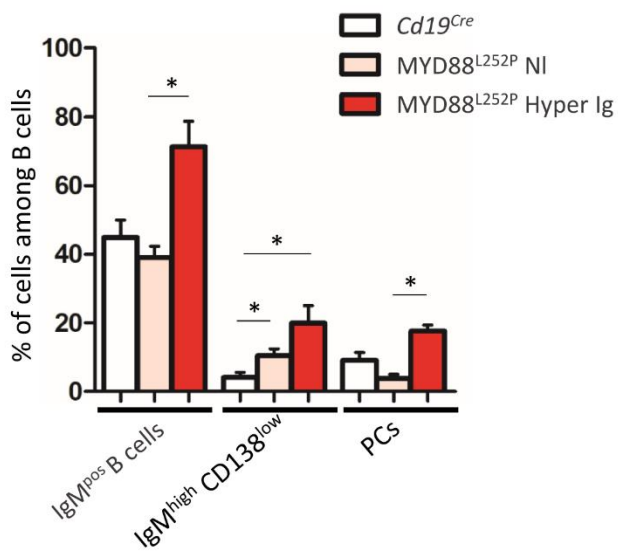
Figure 2C: Percentage of pro-B cells (CD19^{low} B220^{low} and CD43^{low}), CD19^{high} B-cells, Immature B cells (CD19^{high} CD23^{neg}), and recirculating B cells (CD19^{high} CD23^{pos}) in the bone marrow of 16 weeks-old *Cd19^{Cre}* (n=9) and *MYD88^{L252P}* mice (n=9). Results are presented as the mean \pm SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 is symbolized by **.

Figure 3

A



B



C

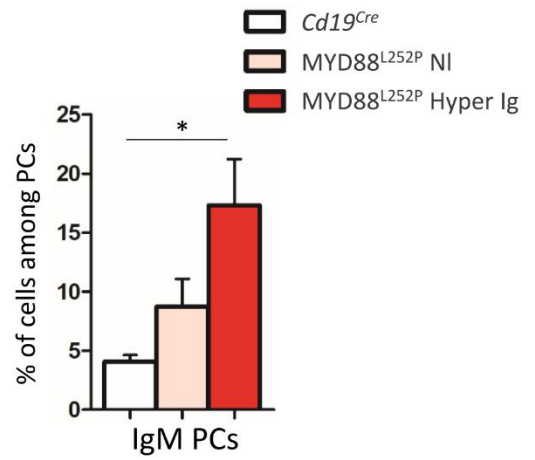


Figure 3: Increase of the IgM PCs compartment in bone marrow of MYD88^{L252P} transgenic mice.

Figure 3A: example of bi and triple parametric flow cytometry histograms gated on CD43^{high} mature B or plasma cells for expression of IgM, B220 and CD138 for *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} mice (left and right panels respectively).

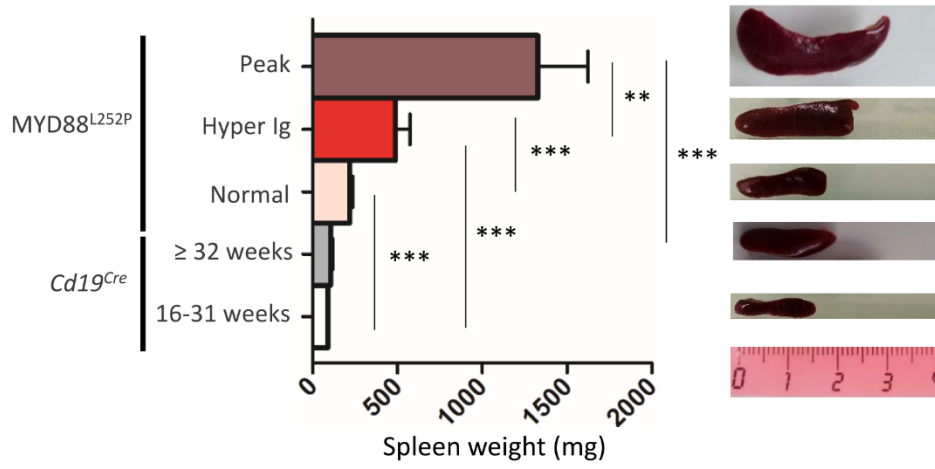
Upper panels: IgM^{low} or neg CD138^{neg}, IgM^{high} CD138^{low}, IgM^{high} CD138^{high} and IgM^{low} CD138^{high} cells were colorized in blue, orange, red and purple respectively using a hinged quadstat of the Kaluza software on and IgM/CD138 biparametric histogram. The hinged quadstat was set-up on *Cd19^{Cre}* mice.

Lower panels: triple parametric histogram using the radar function of the Kaluza software. Note the CD138 expression continuum on MYD88^{L252P} bone marrow B-cells that correlated with progressive decrease of B220 expression. This CD138 expression continuum was virtually absent in *Cd19^{Cre}* mice.

Figure 3B: Percentages of total IgM^{pos} B cells and of IgM^{high} CD138^{low} pre PCs and B220^{low} CD138^{high} PCs in the bone marrow of 16-24 weeks-old *Cd19^{Cre}* (n =6) and MYD88^{L252P} mice with normal SPE or with hyper Ig (n = 6 and n = 3 respectively). Results are presented as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 is symbolized by *.

Figure 3C: Percentages of IgM^{pos} CD138^{high} PCs among total PCs in the bone marrow of 16-31 weeks-old *Cd19^{Cre}* (n =6) and MYD88^{L252P} mice with normal SPE or with hyper Ig (n = 6 and

Figure 4



n = 3 respectively). Results are presented as the mean \pm SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 is symbolized by *.

Figure 4: MYD88^{L252P} mice exhibited a progressively increasing splenomegaly consistently related with the SPE profile. Spleen size of *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} age-paired mice. MYD88^{L252P} mice were sacrificed together with at least one *Cd19^{Cre}* mouse of the same age. Left panel: distribution of the spleen weights; right panel: example of the spleen macroscopy (*Cd19^{Cre}* n = 9 for 16-31 weeks-old and n =16 for \geq 32 weeks; MYD88^{L252P} with normal SPE: n=9; with hyper Ig: n=13; with Ig peak: n =19 for Peak group. Results are presented as the mean \pm SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and p-value < 0.001 are symbolized by ** and *** respectively.

Figure 5

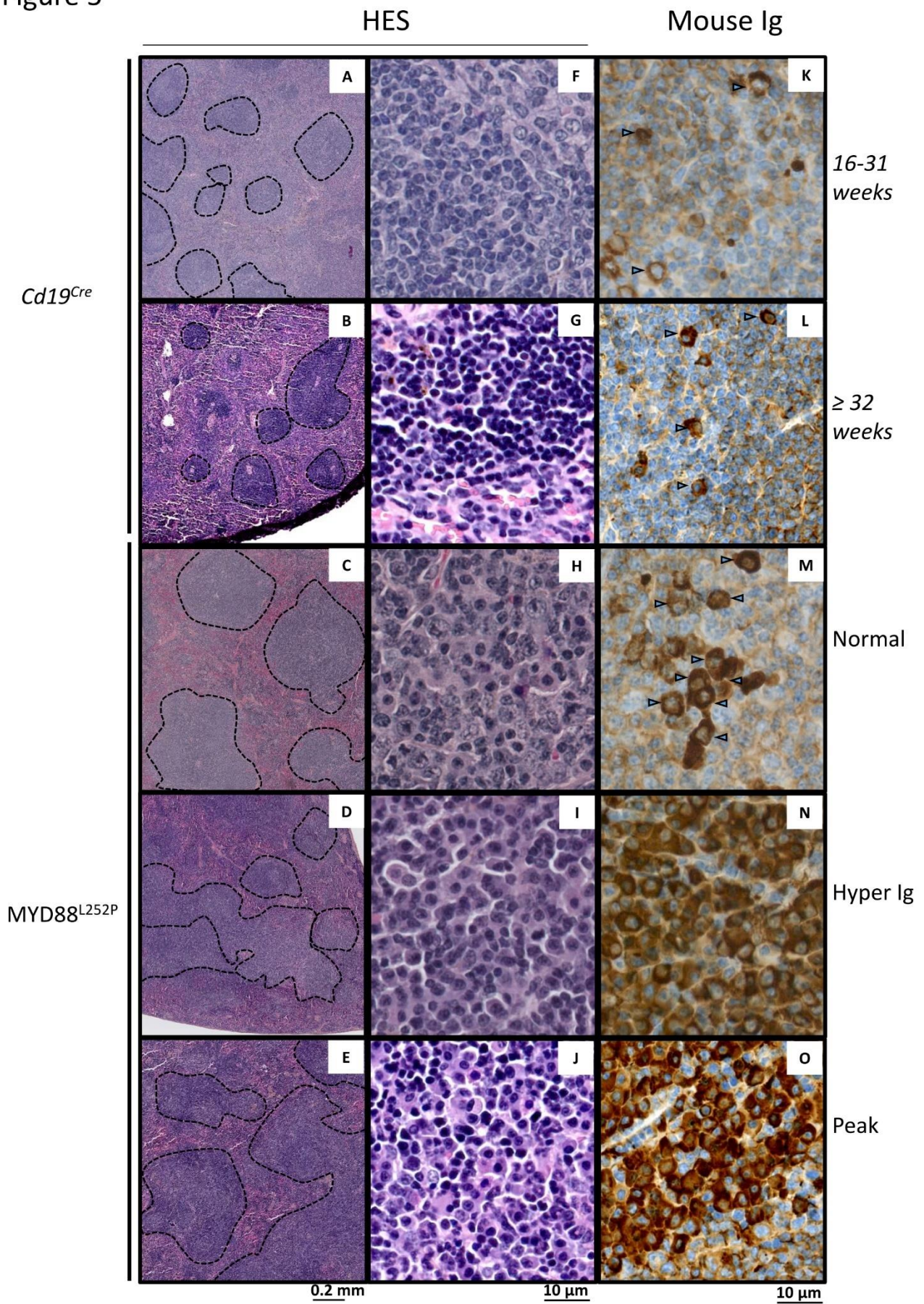


Figure 5: Morphological and immunophenotypic plasma cell engagement of MYD88^{L252P} tumors. Hematein eosin morphological aspect (panels A to J) and intracytoplasmic Ig labeling (panel K to O) of *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} spleens: one 16-31 weeks-old *Cd19^{Cre}* (panels A, F and K), one \geq 32 weeks-old *Cd19^{Cre}* (panels B, G and L) and three MYD88^{L252P} (panels C, H and M for Normal group, D, I and N for Hyper Ig group and E, J and O for Peak group) mice are shown.

Panels A to E: at low magnification, MYD88^{L252P} tumors often exhibited a nodular pattern (panels C to E).

Panels F to J: at high magnification, most MYD88^{L252P} tumors had small B-cell aspects with marked lymphoplasmacytic engagement (panels H to J).

Panels K to O: MYD88^{L252P} tumors with a lymphoplasmacytic aspect exhibited a marked plasma cell differentiation engagement as revealed by the presence of intracytoplasmic Ig in numerous cells (arrows) with various labeling intensities (panels M to O).

Figure 6

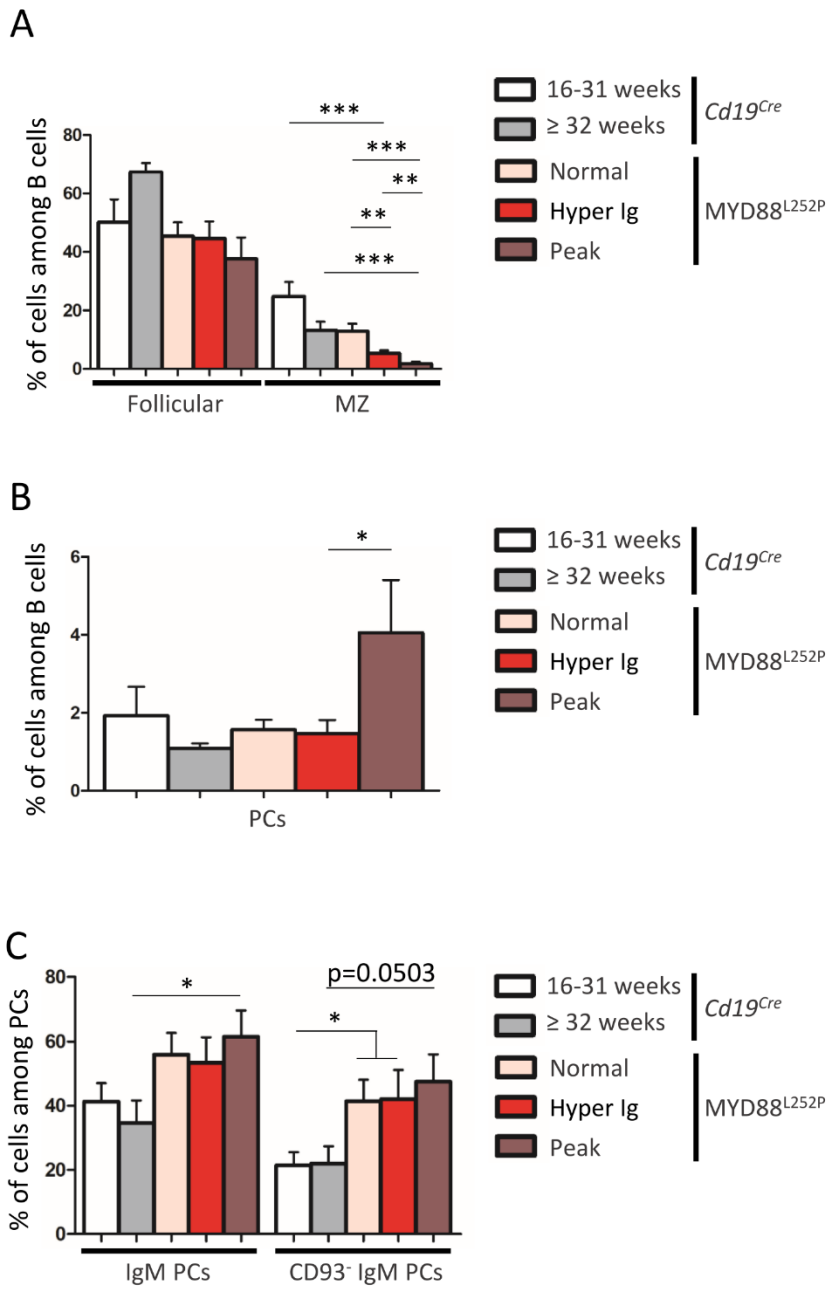


Figure 6: Analysis of B-cell differentiation in spleen of *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} mice.

Figure 6A: Percentage of Follicular B cells (CD21^{pos} CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (CD21^{high} CD23^{pos}).

Figure 6B: Percentage of plasma cells (PCs, B220^{low} CD138^{high}).

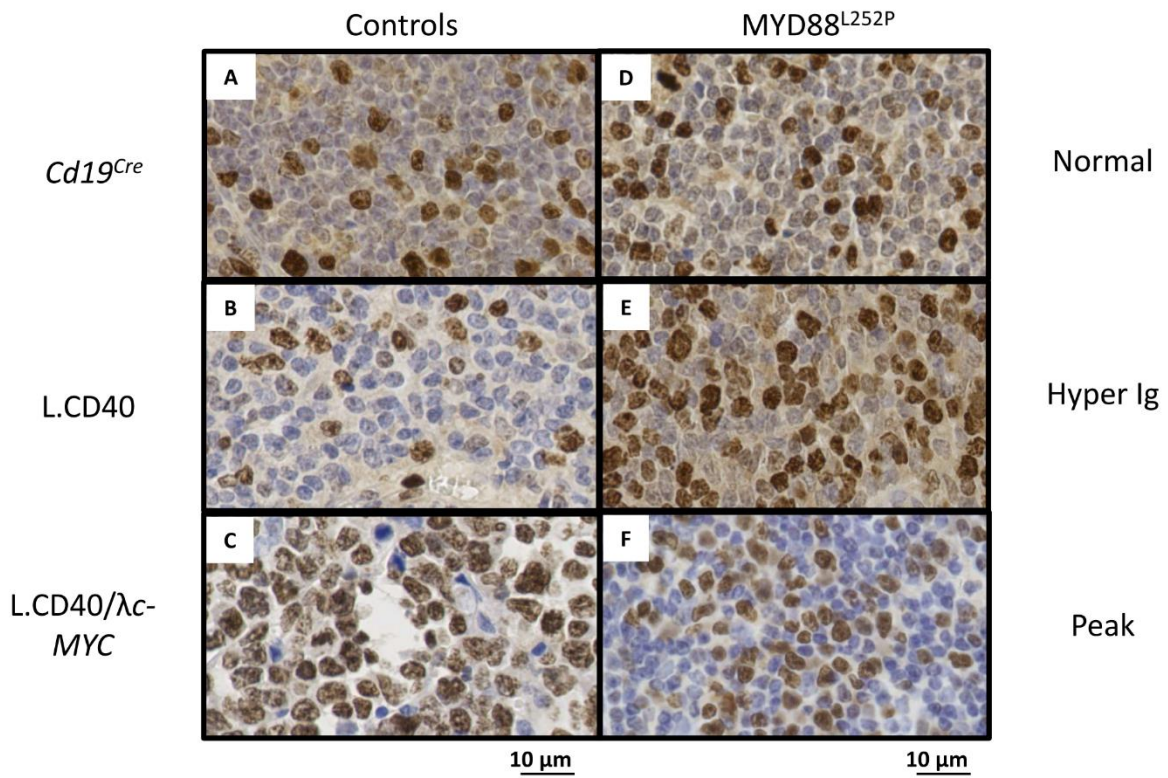
Figure 6C: Percentage of IgM⁺ PCs and of CD93^{neg} IgM PCs.

MYD88^{L252P} mice (with normal SPE: n=7; with hyper Ig: n=10; with Ig peak: n = 9) were compared to *Cd19^{Cre}* mice LMCs (16-31 weeks and \geq 32 weeks-old mice, n = 9 for each group)

Results are presented as the mean \pm SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value < 0.01 and p-value < 0.001 are symbolized by *, ** and ***.

Figure 7

A



B

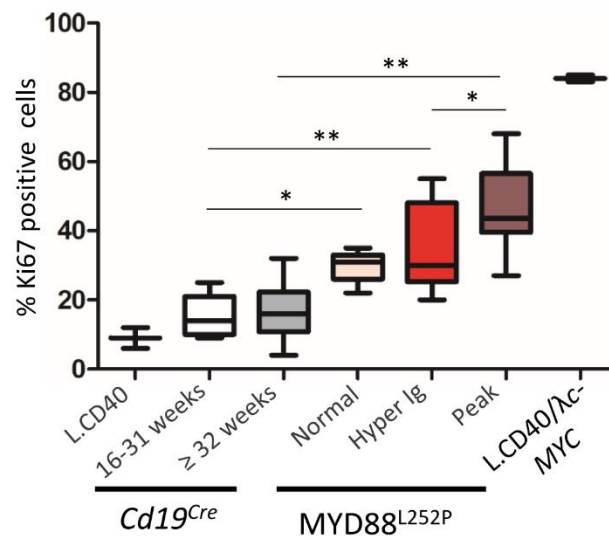


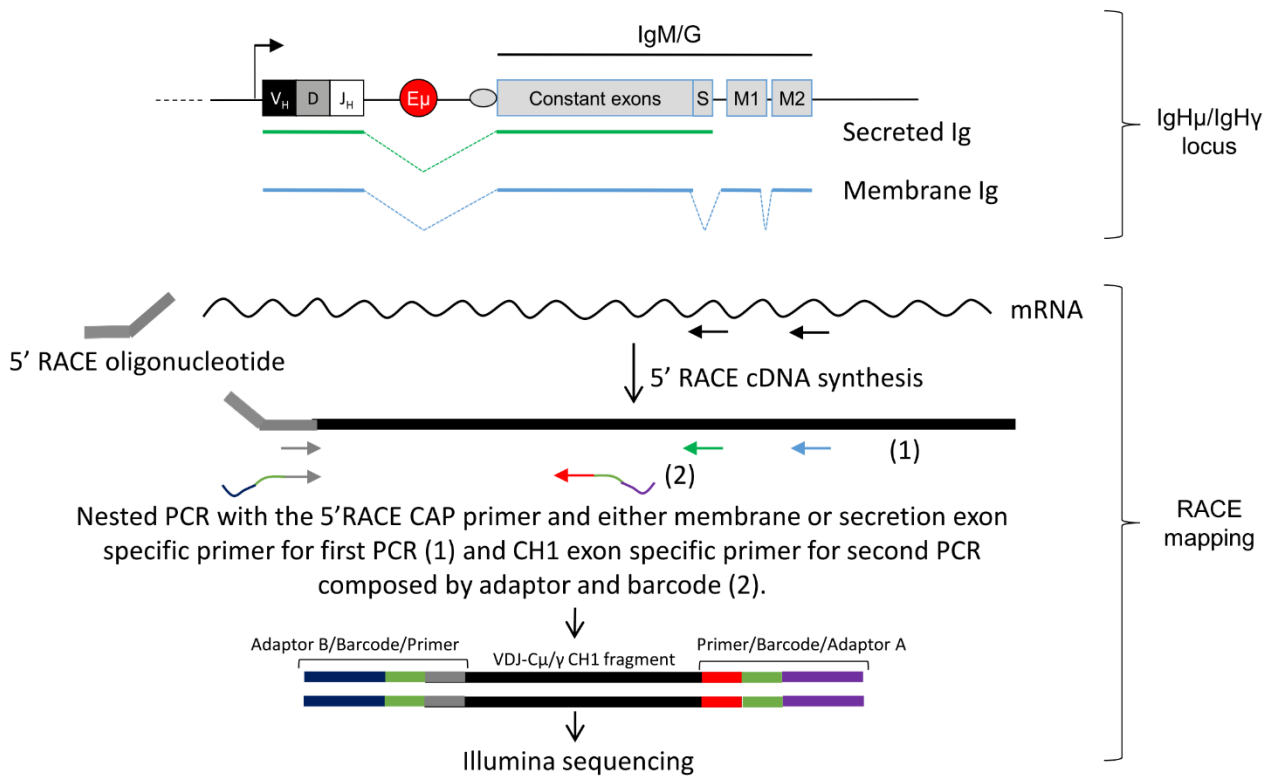
Figure 7: Intermediate increase in MYD88^{L252P} tumor proliferation rate.

Figure 7A: Examples of Ki67 labeling on spleen sections from three controls (left) and three MYD88^{L252P} mice (right, n=28). Controls were *Cd19^{Cre}* LMCs (n = 5 for 16-31 weeks-old mice and n = 8 for ≥ 32 weeks-old mice), L.CD40 mice with a spleen indolent lymphoma of marginal zone B-cells (n=2), as well as L.CD40/ *λ c-Myc* mice (n=2) with a ABC-DLBCL lymphoma (23,27). The three MYD88^{L252P} tumors are one example of each group defined according the SPE profile (normal n = 5, hyper Ig n = 8 and Ig peak n = 15). Here, L.CD40 mice were taken as a model of indolent B-cell lymphoma with a low proliferation index while L.CD40/ *λ c-Myc* mice is a model of aggressive B-cell lymphoma with a high proliferation index.

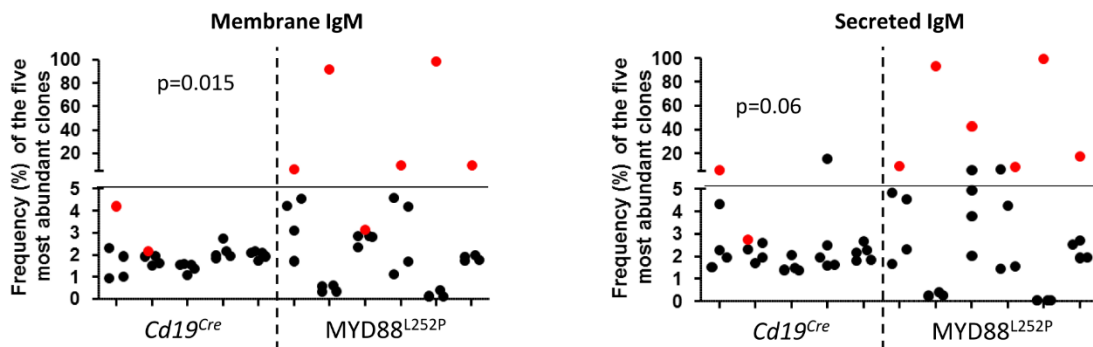
Figure 7B: Quantification of Ki67 labeling. Box plots represent the median and quartile of percentages of Ki67 positive cells. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value < 0.01 are symbolized by * and ** respectively.

Figure 8

A



B



C

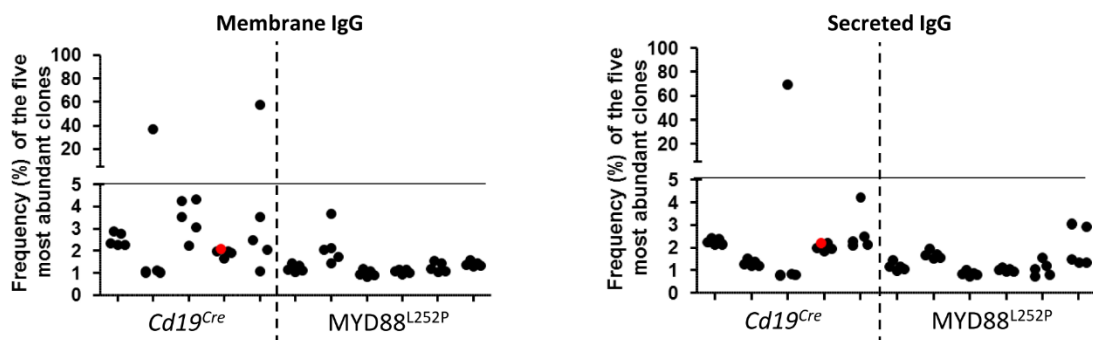


Figure 8: μ and γ heavy chain mRNA clonal abundance analysis:

Figure 8A: RACE PCR technique used to quantify the clonal mRNA abundance of membrane and secreted forms of mouse μ and γ heavy chain.

Igh μ /Igh γ locus (upper panel): *Igh* locus with variable regions (VDJ), the enhancer $E\mu$ and constants genes (for IgM or IgG). Box “S” represents the secreted exon used for the secreted form of Ig, “M1 and M2” represent the membrane exons for the membrane form of Ig. Green or blue dotted lines show the RNA splicing respectively for secreted and membrane Ig.

RACE mapping (lower panel): 5'RACE PCR followed by preparation of the libraries for Illumina sequencing. First, we performed an amplification of the cDNA between either the primer specific for the membrane or secreted form (black arrows) and 5'RACE oligonucleotide. Amplicons for Illumina sequencing were then obtained after two nested PCRs, the first with the 5' Race CAP primer and either membrane (blue arrow) or secretion (green arrow) exon specific primer, and the second with the same 5' primer and a CH1 exon specific primer (grey arrow). For sequencing, forward (grey) and reverse (red) primers used for the second PCR are composed of adaptors (blue and purple) and a barcode (orange), each barcode sequence being specific for one sample only.

Figure 8B and 8C: Relative frequency of the five most abundant mRNA clones coding for the membrane (left) and secreted (right) forms of μ (Figure 8B) and γ (Figure 8C) heavy chains for *Cd19^{Cre}* (n=5) and *MYD88^{L252P}* (n=6) mice. The most abundant clones are highlighted in red when VDJ sequences of the dominant membrane and secreted clones were identical. *MYD88^{L252P}* mice exhibited IgM but not IgG clonal expansion with expression of both secreted and membrane form of the μ chain. Wilcoxon's test p-value are given in the figure.

Figure 9

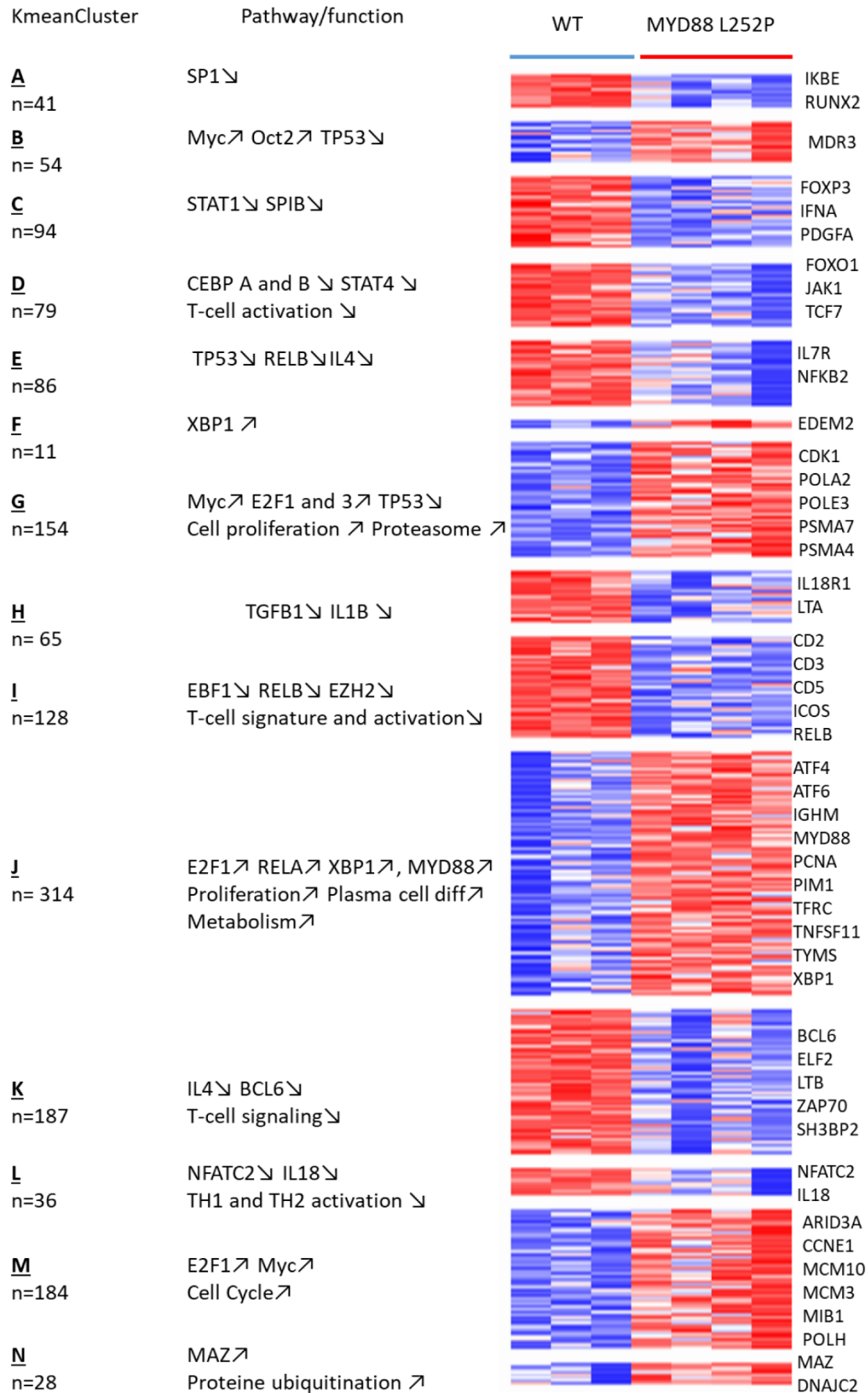


Figure 9: whole transcriptome analysis of *Cd19^{Cre}* and *MYD88^{L252P}* mice: total mRNA was extracted from whole spleen tissues. Gene expression profiles were obtained using the MoGene-2_1-st-v1 Affymetrix chip. Three thousand two hundred thirty six mRNA transcripts were selected to be differentially expressed using the Limma R package. Genes that were too heterogeneously expressed were eliminated, resulting in a final selection of 1515 genes. These genes were partitioned in 40 Kmean clusters. The closest Kmean clusters were merged 2 by 2 according to their proximity by principal component analysis of the mean vectors. This was repeated until maximization of the absolute value of Chi2 (Faumont et al, J Virol 2009). This resulted in 14 aggregated clusters. Functional annotation of the aggregated Kmean clusters was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software.

Annotated heatmap of the 1515 genes are partitioned in the 14 aggregated clusters. On the left are the aggregated Kmean clusters with the corresponding number of genes; on the middle are the main pathways and or function identified with the IPA software, on the right are some relevant genes.

Figure 10

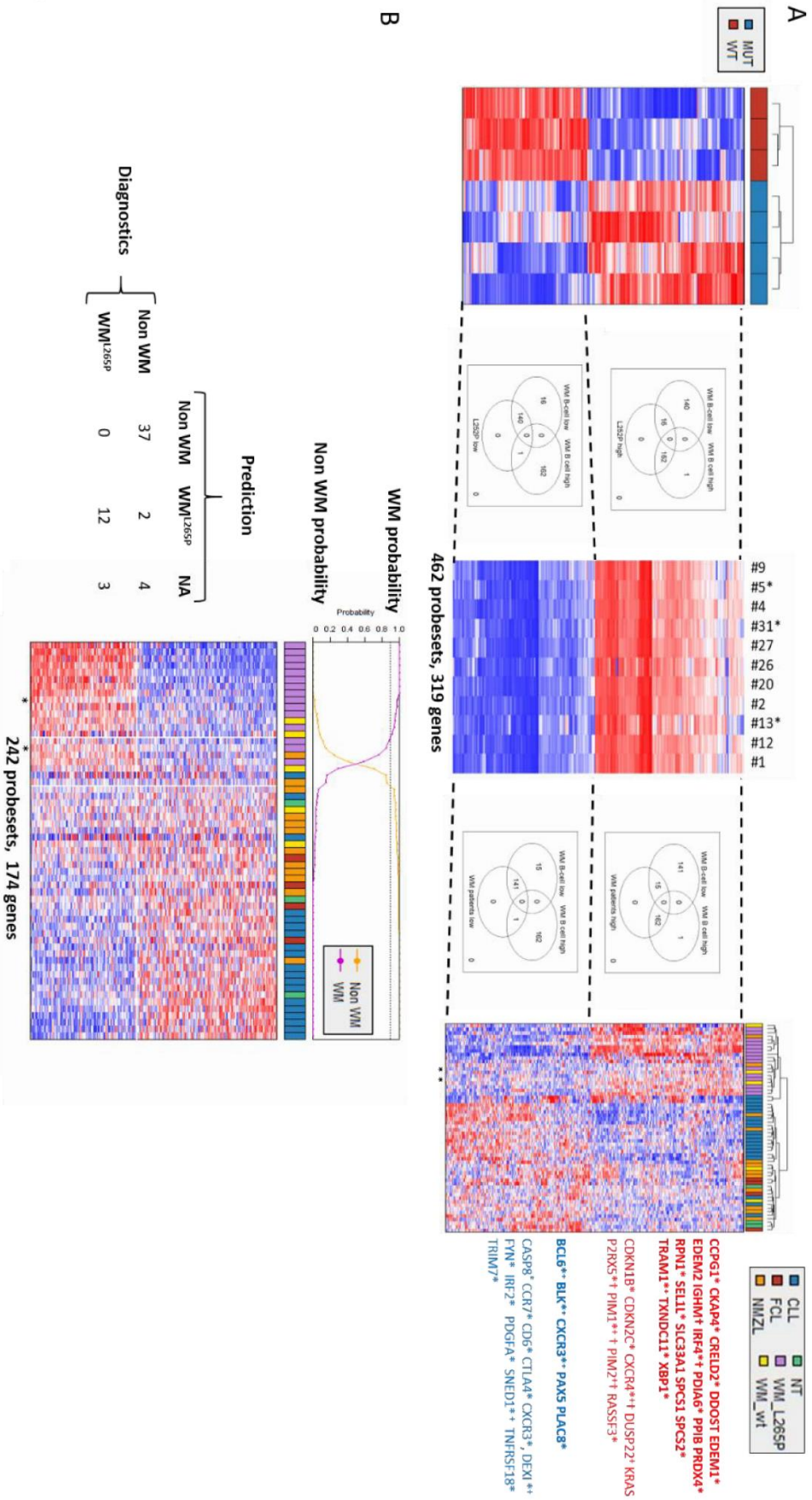


Figure 10: Comparison of gene expression profile (GEP) of MYD88^{L252P} mice and patients with WM or other indolent B-cell NHL. Affymetrix differential gene expression profile (GEP) between four MYD88^{L252P} mice (MUT, n=4) and three *Cd19^{Cre}* mice (WT, n=3) was compared to the Affymetrix GEP of purified bone marrow tumor B-cells from 11 WM patients with the *MYD88^{L265P}* mutation, resulting in selection of 462 probesets (319 genes). This selection was used on the Affymetrix transcriptome of an independent series of lymph node biopsies from 58 patients: 19 *MYD88^{wt}* chronic lymphocytic leukemias (CLL), 15 *MYD88^{L265P}* WM (WM_L265P), 12 *MYD88^{wt}* nodal marginal zone lymphomas (NMZL), 5 *MYD88^{wt}* WM with IgM peaks (WM_WT), 4 follicular lymphomas (FCL) and 3 patients with follicular hyperplasia (NT).

Figure 10A: Hierarchical clustering and heatmap of the 462 selected probesets for mice (left), purified bone marrow *MYD88^{L265P}* WM B-cells (middle) and lymph nodes (right). Down and up-regulated genes are in blue and red respectively. Branches of down and up regulated genes in MYD88^{L252P-YFP} mice, *MYD88^{L265P}* WM bone marrow B-cells and *MYD88^{L265P}* WM lymph nodes are delineated by dashed lines. Venn diagrams of the intersections between the branches are shown, highlighting the consistency between branches across the different clustering. Some genes of interest are noted on the right. In bold are those of the plasma cell signature; *: genes in the predictor (see Figure 7B); +: genes reported by Hunter et al in WM (30); † : genes of the ABC/GC DLBCL signature (29).

Figure 10B: Informativeness of *MYD88^{L265P}* WM diagnosis using the 462 selected probesets defined in Figure 8A. The 462 probesets defined from MYD88^{L252P} mice and bone marrow tumor B-cells of *MYD88^{L265P}* WM patients were used to predict *MYD88^{L265P}* WM diagnosis (WM^{L265P} versus non WM) from other lymphomas within the series of 58 lymph node biopsies.

Probabilities that each sample belongs to WM^{L265P} versus non WM group are indicated. The WM^{L265P} versus non WM or not attributed (NA) assignment is shown on the left.

Supplementary information for:

IgM plasma cell differentiation is at the heart of the MYD88 transforming potential

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

¹ UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL. University of Limoges, and hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges; France.

² UMR CANTHER « CANcer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to THERapies » INSERM 1277-CNRS 9020 UMRS 12. University of Lille., Hematology laboratory, Biology and pathology center, CHU de Lille, 59000 Lille, France.

³ Institut de Recherche Saint-Louis, EMiLy, INSERM U1160, University of Paris, France.

⁴ Pathology Department, Hospital University Center of Bordeaux, Bordeaux, France.

⁵ Laboratory of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France.

***Correspondings Authors:** Christelle Vincent-Fabert (christelle.vincent-fabert@unilim.fr) and Jean Feuillard (jean.feuilleard@unilim.fr).

Supplementary information provided

- Supplementary Materials and Methods
- Additional references
- Supplementary Table 1: MYD88 and CXCR4 mutation status of the 11 WM patients from the series 1 for bone marrow B-cell
- Supplementary Table 2: Main clinical characteristics of patients
- Supplementary Tables 3-10: Excel File for transcriptome analysis
- Supplementary Figure legends (Supplementary Figures 1, 2, 3,4 and 5)

Supplementary Materials and Methods

Sequence of the transgene

EcoRI Ascl Clal Kozak

GAATTCGGCGCGCCATCGATGCCGCC**ATG**TCTGCGGGAGACCCCGCGTGGGATCCGGGTCCTGGACTCCTT
CATGTTCTCCATACCCCTTGGTCGCGCTTAACGTGGGAGTGAGGCGCCGCTATCGCTGTTCTGAACCTCGGA
CGCCCGTGGCGGCCGACTGGACCTTGTGGCGGAGGAGATGGGCTTCGAGTACTTGGAGATCCGAGAGCTGG
AAACGCGCCCTGACCCACTCGCAGTTTGTGGATGCCTGGCAGGGGCGCTCTGGCGCTGTGCGGAGGCT
GCTAGAGCTGCTGGCCTTGTAGACCGTGAGGATATACTGAAGGAGCTGAAGTCGCGCATCG**AGGAGGACTG**
CCAGAAATACTTAGGTAAGCAGCAGAACCAGGAGTCCGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCAGAGTGGAAAGC MYD88
AGTGTCCACAAA**CAAAGGAACTGGGAGGCATCACACCCTTGATGACCCCTAG**GACAAACGCCGGAACCT
TTCGATGCCTTTATCTGCTACTGCCCAACGATATCGAGTTTGTGCAGGAGATGATCCGGCAACTAGAACAGAC
AGACTATCGGCTTAAGTTGTGTGTGTCGACCGTGACGTCTGCCGGCACCTGTGTCTGGTCCATTGCCAGC
GAGCTAATTGAGAAAAG**GTGTCGCGCATGGTGGTGGTTGTTTCTGACGATTATCTACAGAGCAAGGAATGT**
GACTTCCAGACCAAGTTTGCACTCAGCTGTCTCCAGGGTCCAACAGAAGCGA**CCG**ATTCTATTAATACAA
GGCGATGAAGAAGGACTTTCCAGTATCCTGCGGTTCACTACTATATGCGACTATACCAACCCCTGCACCAAGT
CCTGGTCTGGACCCGCTTGCCAAGGCTTTGTCCCTGCCCTGAT**CGATGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTAT** FRT
TCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCctegagggtaccccaattcgcctcc**CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCC**
GCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGG
GCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGG
TCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAACAAACAACGCTCTGTAGCGACCCCTT IRES
GCAGGCAGCGGAACCCCACTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTG
CAAAGCGGCACAACCCCACTGCCAGTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAG
CGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTG
CACATGCTTTACATGTGTTTGTAGTCGAGGTTAAAAACGTTAGGCCCCCGAACCACGGGACGTGGTTTCT
TTGAAAAACACGATGATAAATATGGCCACAaccatgATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT
GCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG
ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTC
GTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC
GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA YFP
CGGCAACATCCTGGGCAACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGCTATATCATGCGCCGACAAGCAG
AAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC
TACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCA
CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA**taatccgggatccggagagctcccaacGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCT** FRT
ATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTCGAGGTTGGATGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAG**CTGTGC**
CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCGGTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTG
TCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTG
GGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
GGCGCGCCGGCCGC

Clal

mutation

Ascl NotI

Screening of ES clones and mice

Primers sequences for screening ES cells and transgenic mice were: 1) for recombined allele,
5pROSA_arm: 5'-CGCCTAAAGAAGAGGCTGTG-3' ; neo1: 5'-GGA TGA TCT GGA CGA AGA GC-3', 2) for

WT allele, Rosa_fw: 5'-CTC TCC CAA AGT CGC TCT G-3' ; Rosa_rev: 5'-TAC TCC GAG GCG GAT CAC AAG C-3' ; 3) for CD19_Cre allele, CD19c: 5'-AAC CAG TCA ACA CCC TTC C-3' ; CD19d: 5'-CCA GAC TAG ATA CAG ACC AG-3' ; CD19Cre7: 5'-TCA GCT ACA CCA GAG ACG G-3'.

Flow cytometry

For bone marrow analysis, antibodies used were: CD19 BV510 (clone 1D3, BD Biosciences, San Jose, California), CD21 PECF594 (clone 7G6, BD Biosciences, San Jose, California), CD23 BV711 (clone B3B4, BD Biosciences, San Jose, California), IgM PC7 (clone eB121-15F9, Invitrogen), IgD PerCpCy5.5 (clone 11-26c.2a, BD Biosciences, San Jose, California), CD38 APC-R700 (clone 90, Invitrogen), CD138 Biot- (clone 281-2, Biolegend , San Diego, California), Streptavidin BV786 (BD Biosciences, San Jose, California), CD93 BV650 (clone AA4.1, BD Biosciences, San Jose, California).

For splenocytes, antibodies used were: CD80 APC, (clone 16-10A1, Biolegend , San Diego, California), CD86 PE-Cy7 (clone GL-1, Biolegend , San Diego, California), CD3 APC (clone 17 A2, Biolegend , San Diego, California), CD45R/B220 BV421 (clone RA3-6B2, Biolegend, San Diego, California), CD138 APC-R700 (clone 281-2, BD Biosciences, San Jose, California).

Bioinformatics analysis of transcriptomes

All analyses were performed with the version 1.1.463 and 3.6.1 of RStudio and R (Free Software Foundation, Inc, Boston, MA). RMA normalization was done with the “oligo” R package (1). This resulted in a table giving the normalized signal intensity of 54675 and 770069 probesets for Human Genome U133 Plus 2.0 and MoGene-2_1-st-v1 chips respectively, the latter corresponding to 41345 transcripts. After filtering invariant and unannotated probesets, differential analysis was performed with the “Limma” R package (2). For the MoGene-2_1-st-v1 chip, signal levels of selected probesets were mean-aggregated according the Affymetrix transcript_cluster_id. Unsupervised clustering were

performed with the LPS package. Mouse plasma cell signatures were issued from (3) as well as from GSEA website (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) (4,5). Unsupervised clustering and Linear Predicting Score were done using the LPS package (<https://bioinformatics.ovsa.fr/LPS> and (6)).

Repertoire analysis

Primers were: 1) for membrane μ exon, Mm_IgM_Memb_rev: 5'-TTC CTC CTC AGC ATT CAC CT-3' ; 2) for membrane γ exon, Mm_IgG_Memb_rev : 5'-GCT GAT GAA GAT GGT GAT GG-3' ; 3) for secreted μ exon, Mm_IgM_Sec_rev: 5'-CGC TAG CAT GGT CAA TAG CA-3' ; 4) for secreted γ exons, Mm_IgG1_Sec_rev : 5'-CAA GGA CAC TGG GAT CAT TTA C-3', Mm_IgG2A-B_Sec_rev : 5'-TGG GTG CTG AGC TCA TTT AC-3', Mm_IgG2C_Sec_rev : 5'-GAA AGA ACC AGG ACA GTT TTA C-3', Mm_IgG3_Sec_rev : 5'-CTA GGT GCT GTT CTC ATT TAC-3' .

Additional references

1. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. 1 oct 2010;26(19):2363-7.
2. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 20 avr 2015;43(7):e47.
3. Shi W, Liao Y, Willis SN, Taubenheim N, Inouye M, Tarlinton DM, et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat Immunol*. juin 2015;16(6):663-73.
4. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. juill 2003;34(3):267-73.
5. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 25 oct 2005;102(43):15545-50.
6. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. mars 2016;55(3):251-67.

Supplementary Table 1: MYD88 and CXCR4 mutation status of the 11 WM patients for bone marrow B-cell

UPN	Sex	MYD88 L265P	CXCR4 mutation
# 1	Male	Positive	Negatif
# 2	Female	Positive	Negatif
# 4	Male	Positive	Negatif
# 5	Female	Positive	Positive
# 9	Male	Positive	Negatif
# 12	Male	Positive	Negatif
# 13	Male	Positive	Positive
# 20	Male	Positive	Negatif
# 26	Male	Positive	Negatif
# 27	Female	Positive	Negatif
# 31	Female	Positive	Positive

UPN : unique patient number

Supplementary Table 2: main clinical characteristics of patients

Dg	N	Age (mean +/- SD)	Sex ratio	Immunoglobulin Peak	Bone Marrow involvement	Spleen enlargement	CXCR4 mutation
WM MYD88 ^{mut}	15	65.2+/- 9.7	4	100%	100%	27% (4/15)	18%
WM/LPL MYD88 ^{wt}	5	65.5 +/- 4.5	5	80%	60% (3/5)	20% (1/5)	
CLL	19	65.9 +/- 12.3	2.2	11%	NE	67% (6/19)	
NMZL	12	67.6 +/- 11	1.4	50%	37% (4/12)	37% (4/12)	
FCL	4	60.3 +/- 3	3				
FH	3	38.3 +/- 14.6	0.33				

Dg : diagnosis ; N : number of cases ; SD : standard deviation ; WM : Waldenström Macroglobulinemia ; LPL : lymphoplasmacytic lymphoma ; CLL : chronic lymphocytic leukemia ; NMZL : nodal marginal zone lymphoma ; FCL : follicular cell lymphoma ; FH : benign follicular hyperplasia ; MYD88^{mut} : mutated MYD88 gene ; MYD88^w : wild type MYD88 gene ; NE : not evaluated.

Supplementary Tables 3-10: Excel File for transcriptome analysis

Supplementary Figure legends (Supplementary Figures 1, 2, 3, 4 and 5)

Supplementary Figure 1: *In vitro* model with expression of *Myd88*^{L252P}-IRES-*Yfp* insert

Figure 1A: schematic representation of the *Myd88*^{L252P}-IRES-*Yfp* insert: the *Myd88*^{L252P} sequence was in frame with the Internal Ribosomal Entry Site (IRES) and the coding sequence for Yellow Fluorescent Protein (*Yfp*). This 2.6 kB sequence was directly synthesized and cloned within the pcDNA3.1 vector upstream from the pCMV promoter (pcDNA3.1/*Myd88*^{L252P} vector). As a control the same construct with the wild type *Myd88* sequence was built (pcDNA3.1/*Myd88*^{WT} vector).

Figure 1 B: MYD88 protein expression after transfection of A20 murine B-cells. Empty pcDNA3.1 (Ctrl), pcDNA3.1/*Myd88*^{L252P} (L252P) and pcDNA3.1/*Myd88*^{WT} (WT) vectors were transiently transfected into A20 murine B-cells. MYD88 protein expression of non-transfected (NT) and transfected cells was assessed by Western blot. Revelation of tubulin was used as a loading protein control.

Figure 1C: Flow cytometry detection of YFP 48H after transfection of A20 murine B-cells with either the empty pcDNA3.1 (Ctrl), pcDNA3.1/*Myd88*^{L252P} (L252P) and pcDNA3.1/*Myd88*^{WT} (WT) vectors. Percentages of positive cells are indicated in each histogram.

Figure 1D: Luciferase gene reporter assay: A20 murine B cells were co transfected with either the empty pcDNA3.1 (Ctrl) , pcDNA3.1/*Myd88*^{L252P} (L252P) and pcDNA3.1/*Myd88*^{WT} (WT) vectors and the *Renilla luciferase* vector (pRL-TK) which harbors the luciferase reporter gene downstream from the CMH class I NF-kappa B binding site (3X-κB-L) or its mutated inactive variant (3X-mutκB-L).

Figure 1E: Targeting strategy for insertion of a conditional *Myd88*^{L252P}-IRES-*Yfp* (MYD88^{L252P-flSTOP}) into the murine *Rosa26* locus. This strategy was similar to the one published by Hömig-Hölzel et al (41).

Briefly, CRE mediated recombination leads to deletion of the stop cassette and expression of the *Myd88^{L252P}*-IRES-Yfp insert (MYD88^{L252P} mice) under transcriptional control of the endogenous *Rosa26* promoter. STOP: Stop cassette.

Figure 1F: Flow cytometry detection of YFP in T and B cells from peripheral blood (upper panel) or splenocytes (lower panel) of 6 months old MYD88^{L252P} mice. Gating done on CD3 positive and B220 positive lymphocytes for T and B cells respectively.

Figure 1G: *Tnfrsf3* expression analysis by quantitative RT-PCR in splenocytes. mRNA levels from 12 months-old MYD88^{L252P} mice compared to their LMC *Cd19^{Cre}* were normalised to *Hprt* expression (n=3) for each group. Results are expressed as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value <0.05 is symbolized by *.

Supplementary Figure 2: Distribution of spleen B/T cell ratio from aged *Cd19^{Cre}* (n=9) and MYD88^{L252P}(n=14) mice (≥ 32 weeks old). Results are expressed as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value <0.001 is symbolized by ***.

Supplementary Figure 3: Cytological aspect of spleen imprints from one *Cd19^{Cre}* (left) and two MYD88^{L252P-YFP} mice. Cells from MYD88^{L252P} spleen exhibited marked lymphoplasmacytic morphology. Examples of these lymphoplasmacytic cells are surrounded by dashed black lines.

Supplementary Figure 4: *In vivo* proliferation index of spleen B cells from *Cd19^{Cre}* and MYD88^{L252P} mice. BrdU was intra peritoneally injected 18 hours before sacrifice. Percentage of BrdU positive B cells was assessed by flow cytometry. The red square represents a mouse with a tumor in

transformation whereas black squares indicate mice with LPL phenotype. Wilcoxon's test p-value < 0.05 is symbolized by *.

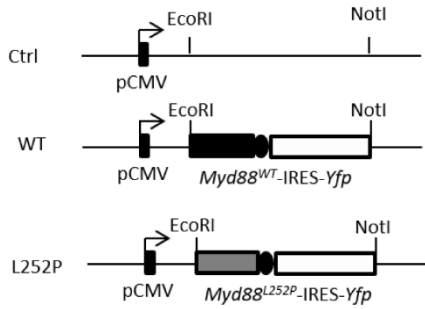
Supplemental Figure 5: Aggregation of the 40 Kmean clusters generated from the 1515 differentially expressed genes between *Cd19^{Cre}* and *MYD88^{L252P}* mice: total mRNA was extracted from whole spleen tissues. Gene expression profiles were obtained using the MoGene-2_1-st-v1 Affymetrix chip. Three thousand two hundred thirty six mRNA transcripts were selected to be differentially expressed using the Limma R package. Genes that were too heterogeneously expressed were eliminated, resulting in a final selection of 1515 genes. These genes were partitioned in 40 Kmean clusters. Each Kmean cluster was taken as a metagene, corresponding to the expression mean of the genes from a given cluster for each sample. An Euclidean distance between each metagene was calculated after principal component analysis using the first two components. The two closest Kmean clusters (metagene or mean vectors) were merged. This was repeated until maximization of the absolute value of Chi2 (Faumont et al, J Virol 2009). This resulted in 14 aggregated clusters. Functional annotation of the aggregated Kmean clusters was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software.

Left panel: principal component analysis (upper) and heatmap with its hierarchical clustering (lower) of the 40 Kmean clusters taken as metagenes. On the periphery of the PCA graph and on the right of the heatmap are the arbitrary numbers of the 40 Kmean clusters.

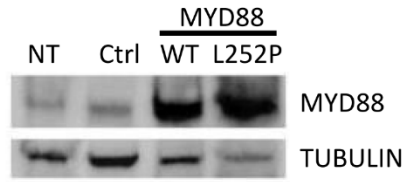
Right panel: principal component analysis (upper) and heatmap with its hierarchical clustering (lower) of the 14 aggregated Kmean clusters taken as metagenes. On the periphery of the PCA graph and on the right of the heatmap are the list of Kmean clusters aggregated together.

Sup Figure 1

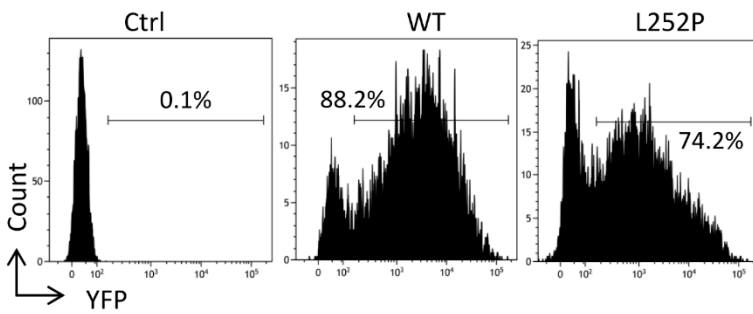
A



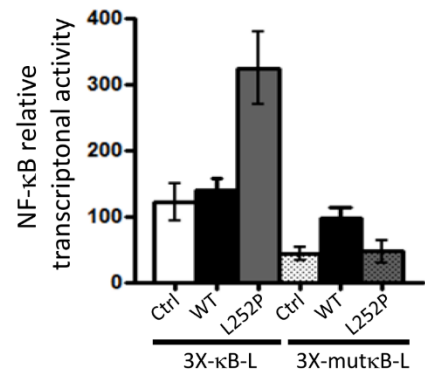
B



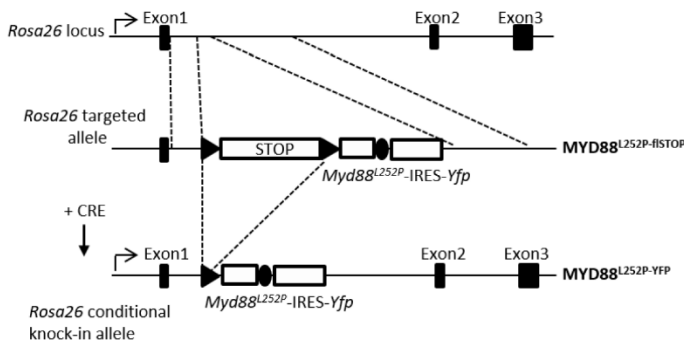
C



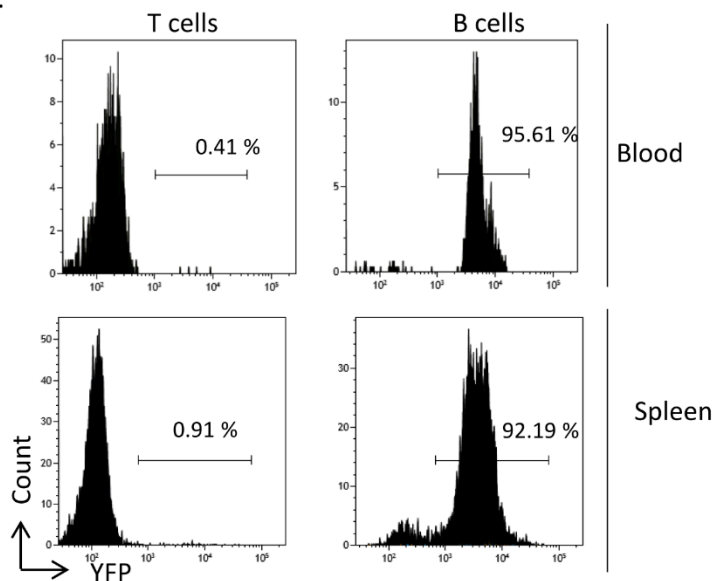
D



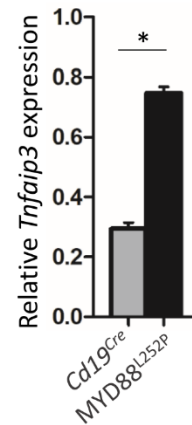
E



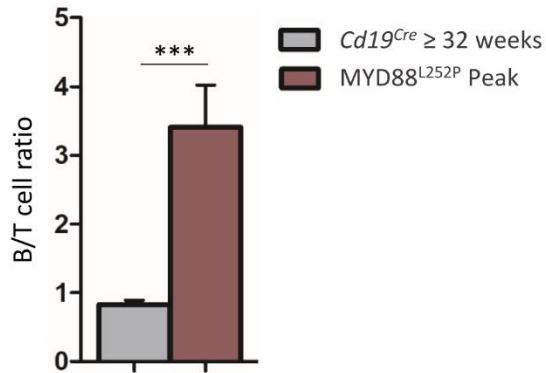
F



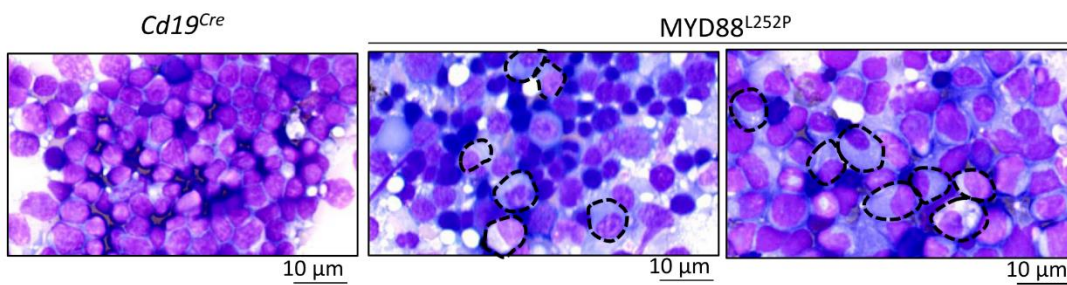
G



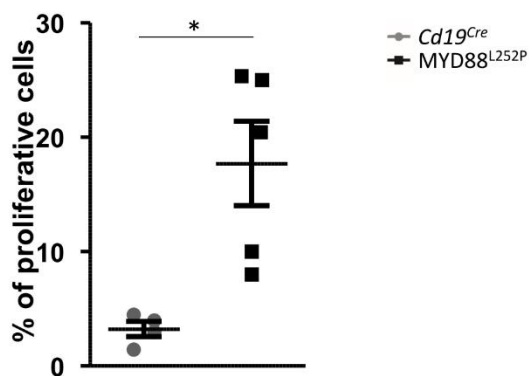
Sup Figure 2



Sup Figure 3



Sup Figure 4

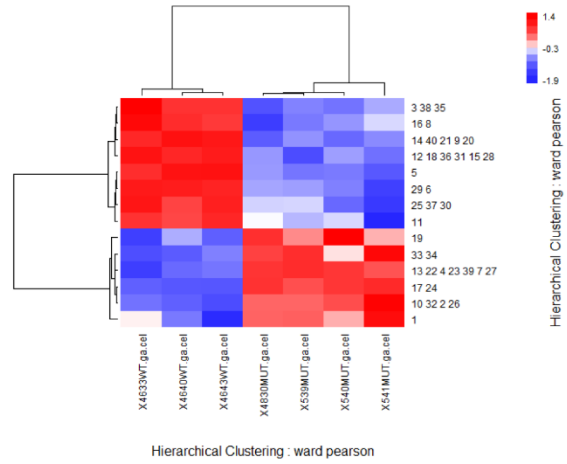
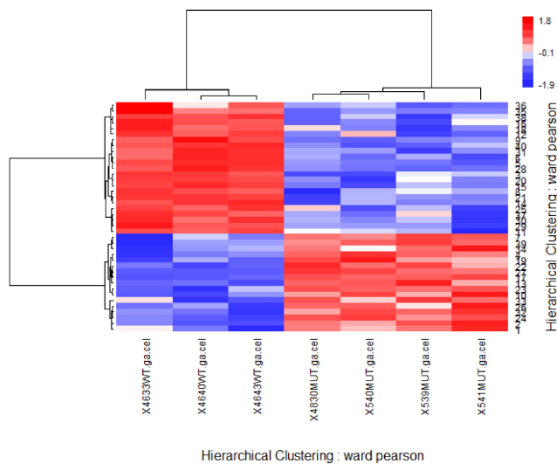
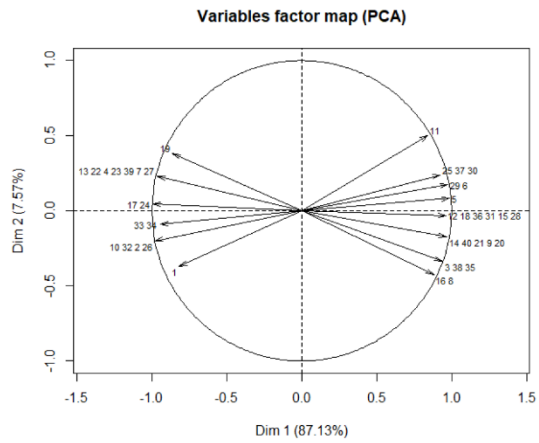
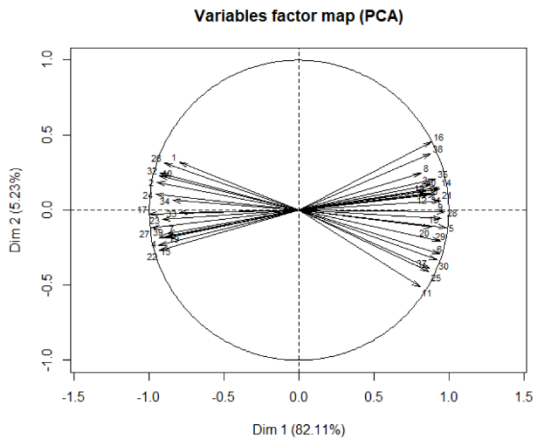


Supplementary Figure 5

1515 genes
40 K mean clusters



1515 genes
14 aggregated K-mean clusters



III.2. Etude de l'échappement immunitaire dans les lymphomes liés à l'EBV

III.2.1. Synthèse de l'article

L'EBV peut être lié à divers troubles lymphoprolifératifs des cellules B, notamment au lymphome de Hodgkin, au lymphome de Burkitt, aux lymphomes diffus à grandes cellules B et au lymphome primitif des séreuses (Shannon-Lowe et Rickinson 2019). Les cellules B proliférantes, possédant l'EBV en latence III surexprimant PD-L1 inhibent les cellules T effectrices et cellules NK autologues (Durand-Panteix et al. 2012; Goodman, Patel, et Kurzrock 2017). Il est aussi connu que l'IL-10, cytokine immunosuppressive est surexprimée par les cellules B infectées par l'EBV (Taga et al. 1995; Sarris et al. 1999). Ces caractéristiques, semblables à celles des lymphocytes B régulateurs (Breg), nous ont amenés à nous intéresser aux autres facteurs de la tolérance immunitaire tels que la sécrétion de molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives l'IL-35 et le TGF- β 1 ainsi qu'à l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Rosser et Mauri 2015; Mauri et Menon 2015; Rincón-Arévalo et al. 2016)

Au cours de ces expérimentations nous avons pu prouver que les cellules B transformées par l'EBV en latence III ont un profil immunorégulateur. Ceci se traduit par une expression élevée de PD-L1 via la signalisation de la protéine virale LMP1, mais aussi par une augmentation de la sécrétion d'IL-10, de TGF- β 1 et des deux sous-unités de IL35 (EBI3 et IL12A). De plus, nous avons mis en évidence la capacité de ces cellules B EBV en latence III, à inhiber la prolifération des cellules T autologues. Ceci est en partie dû à l'expansion des cellules T régulatrices conventionnelles et non conventionnelles dépendant de l'axe PD-1/PD-L1.

Ces caractéristiques démontrent pour la 1^{ère} fois que les cellules B EBV miment phénotypiquement et fonctionnellement les Breg et ont la capacité de moduler la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui expliquerait pourquoi certaines de ces cellules échappent à la réponse immunitaire anti-EBV. La dérégulation de PD-L1 a été mise en évidence dans de nombreux cancers dont des lymphomes B non liés à l'EBV (Xing et al. 2016). Parmi les DLBCL, ceux exprimant PD-L1 sont associés à de mauvais pronostics (Kiyasu et al. 2015). C'est pourquoi les thérapies visant l'axe PD-1/PD-L1 se sont avérées efficaces (Galanina, Kline, et Bishop 2017).

III.2.2. Article



CYTEK
TRANSCEND THE CONVENTIONAL

SEE WHAT YOU'VE BEEN MISSING

ADVANCED FLOW CYTOMETRY
THAT REVEALS 30+ COLORS

LEARN MORE



EBV Latency III–Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1–Dependent Manner

This information is current as of September 4, 2019.

Héloïse Auclair, Catherine Ouk-Martin, Lilian Roland, Pauline Santa, Hazar Al Mohamad, Nathalie Faumont, Jean Feuillard and Chantal Jayat-Vignoles

J Immunol published online 21 August 2019
<http://www.jimmunol.org/content/early/2019/08/20/jimmunol.1801420>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2019/08/20/jimmunol.1801420.DCSupplemental>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews!** 30 days* from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

*average

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Author Choice Freely available online through *The Journal of Immunology* [Author Choice option](#)

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2019 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



EBV Latency III–Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1–Dependent Manner

Héloïse Auclair,* Catherine Ouk-Martin,*¹ Lilian Roland,*¹ Pauline Santa,*
Hazar Al Mohamad,* Nathalie Faumont,* Jean Feuillard,*[†] and Chantal Jayat-Vignoles*

EBV infects and immortalizes B cells in vitro and in vivo. It is the causative agent of most immune deficiency–related lymphoproliferative disorders and is associated with various lymphomas. EBV latency III–transformed B cells are known to express two immunosuppressive molecules, IL-10 and PD-L1, two characteristics of regulatory B cells (Bregs). In this study, we show that, in addition to secretion of the Breg immunosuppressive cytokines IL-10, IL-35, and TGF- β 1, EBV latency III–transformed B cells were able to repress proliferation of their autologous T cells preactivated by CD2, CD3, and CD28. This inhibitory effect was likely caused by CD4⁺ T cells because EBV latency III–transformed B cells induced a strong proliferation of isolated autologous CD8 T cells. Indeed, EBV was able to promote expansion of autologous FOXP3⁺ CD39^{high} CTLA4⁺, Helios⁺, GITR⁺, LAG3⁺ CD4 T cells (i.e., regulatory T cells [Tregs]). Two types of Tregs were induced: unconventional CD25^{neg} and conventional CD25^{pos} Tregs. These Tregs expressed both the latency-associated peptide (LAP) and the PD-1 receptor, two markers of functional Tregs. Expansion of both Treg subtypes depended on PD-L1, whose expression was under the control of LMP1, the main EBV oncogene. These results demonstrate that, like Bregs, EBV latency III–transformed B cells exhibit strong immunoregulatory properties. These data provide clues to the understanding of how after EBV primo-infection, EBV-proliferating B cells can survive in an aggressive immunological environment and later emerge to give rise to EBV-associated B cell lymphomas such as in elderly patients. *The Journal of Immunology*, 2019, 203: 000–000.

The EBV infects ~95% of the worldwide adult population. When EBV infects B cells, its linear dsDNA is circularized (EBV episome) in the nucleus, and the full range of EBV latent genes is transcribed. By subverting some key activation pathways, this latency program, called latency III or proliferation program, leads to immortalization of the infected B cells. For example, Epstein-Barr nuclear Ag 2 (EBNA2), which orchestrates the latency III/proliferation program, reroutes the Notch pathway by targeting the cellular RBP-J κ DNA-binding factor. The viral latent membrane proteins LMP1 and 2A, whose expression is under the control of EBNA2, provides constitutive survival signals that mimic those of CD40 and the BCR, respectively (1).

Despite its B cell immortalization capability, EBV primo-infection is spontaneously resolved, either asymptotically or after the symptomatic phase (infectious mononucleosis) due to a vigorous immune response. However, the EBV episome will never be eliminated by the host immune system. It remains hidden in the nucleus of memory B cells, resulting in the establishment of a life-long persistent infection after clinical resolution of the primary EBV infection. This demonstrates that some EBV-proliferating B cells can escape the host immune system. Any rupture of balance between the immune system of the host and the virus may lead to development of an EBV-associated cancer. EBV is the causative agent of immune deficiency–related lymphoproliferative disorders, such as post-transplant lymphoproliferative disorders and AIDS-associated B cell lymphomas (2, 3). EBV is associated with some solid tumors, such as gastric carcinomas or nasopharyngeal carcinomas, as well as with various lymphoproliferative disorders, including Hodgkin lymphoma (HL), Burkitt lymphoma (BL), or diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs) of the elderly.

With others, we showed that EBV-proliferating B cells overexpressed PD-L1/CD274/B7H1, leading to decreased autologous anti-EBV cytotoxicity (4, 5). Secretion of the immunosuppressive IL-10 by EBV-infected B cells, either in vitro or in vivo during infectious mononucleosis or HL, was reported many years ago (6, 7). IL-10, a major factor of human B cell activation, proliferation, and differentiation (8), is also a key immunosuppressive cytokine of regulatory B cells (Bregs), a B cell subset that supports immunological tolerance (9, 10). Bregs contribute to immune suppression during various infectious diseases or in pathogenesis of autoimmune and neoplastic disorders (11–13). Breg properties are related to a variety of mechanisms, including secretion of anti-inflammatory and immunosuppressive molecules such as IL-10, IL-35, and TGF- β 1, or expression of the immunosuppressive molecule PD-L1. Bregs are able to inhibit proliferation of

*UMR CNRS 7276, INSERM 1262, Faculté de Médecine, Université de Limoges, F-87025 Limoges Cedex, France; and [†]Le Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, F-87042 Limoges Cedex, France

¹Authors contributed equally.

Received for publication October 23, 2018. Accepted for publication July 16, 2019.

This work was supported by CNRS, Ligue Nationale contre le Cancer, Ligue Régionale contre le Cancer (Limousin), and Comité Orientation Recherche Cancer du Limousin.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Chantal Jayat-Vignoles, UMR CNRS 7276, INSERM 1262, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2, rue du Docteur Marcland, F-87025 Limoges Cedex, France. E-mail address: chantal.vignoles@unilim.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: B/T, B cell/T cell; BL, Burkitt lymphoma; Breg, regulatory B cell; CT, cycle threshold; cTreg, conventional Treg; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; F, forward; HL, Hodgkin lymphoma; LAP, latency-associated peptide; LCL, lymphoblastoid cell line; LMP1-Wt, LMP1 wild type; Luc, luciferase; R, reverse; Treg, regulatory T cell; uTreg, unconventional Treg; VPD450, Violet Proliferation Dye 450.

This article is distributed under The American Association of Immunologists, Inc., [Reuse Terms and Conditions for Author Choice articles](#).

Copyright © 2019 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/19/\$37.50

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1801420

Downloaded from <http://www.jimmunol.org/> at INSERM DISC DOC on September 4, 2019

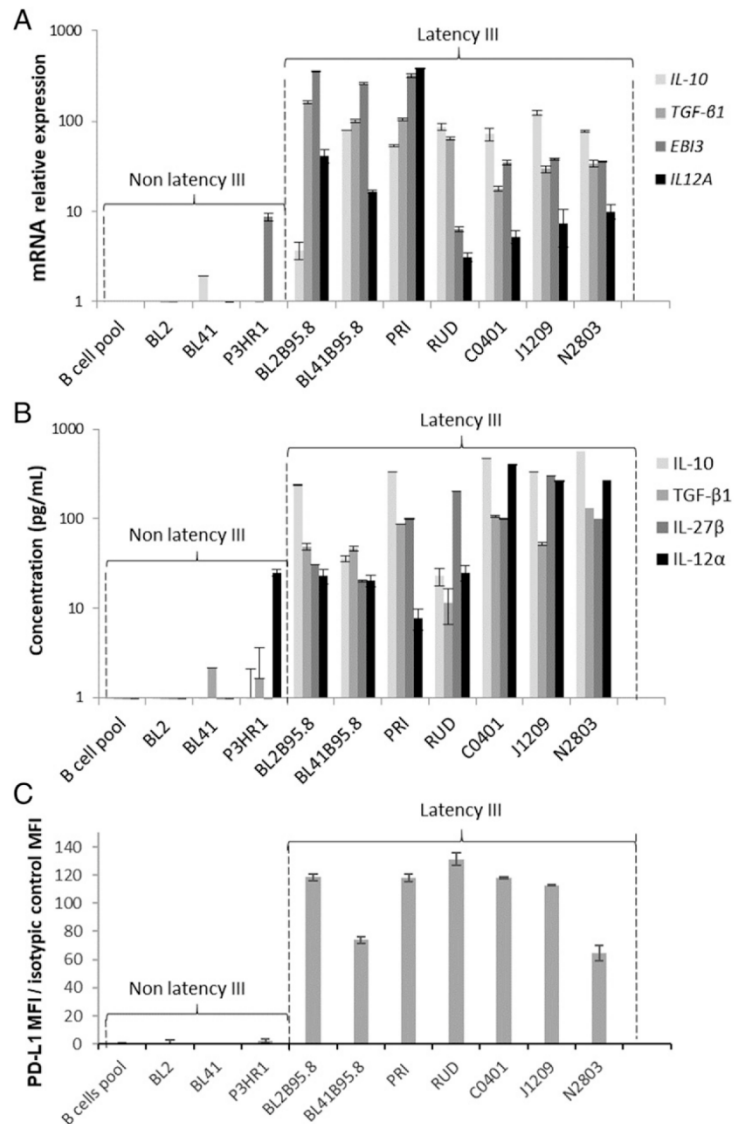


FIGURE 1. EBV latency III B cells overexpress Breg immunosuppressive molecules. Expression of IL-10, TGF-β1, and IL-35 was studied by reverse transcriptase quantitative PCR and ELISA. **(A)** mRNA expression of *IL-10*, *TGF-β1*, and *IL-35* (*EB13* and *IL12A* genes) was increased in EBV latency III B cells. **(B)** Secretion of IL-10, TGF-β1, and IL-35 (IL-27β and IL-12α subunits) was increased in EBV latency III B cells. Expression of PD-L1 was studied by flow cytometry. **(C)** PD-L1 was overexpressed on EBV latency III B cells. Each experiment was performed at least four times.

effector T cells and can induce CD4-positive regulatory T cell (Treg) expansion (9, 10, 14).

In this study we explored the immunoregulatory potential of EBV latency III-transformed B cells, especially in connection with PD-L1. These cells expressed the Breg immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-β1 as well as the two subunits IL-12α and CD27β of IL-35. They were also able to repress proliferation of autologous activated T cells. Expressing PD-L1 in an LMP1-dependent manner, EBV latency III-transformed B cells were strong inducers of conventional Tregs (cTregs) and unconventional Tregs (uTregs) in a PD-L1-dependent manner. These features demonstrate that EBV-proliferating B cells have the ability to moderate the host immune response, which would explain why some of these cells constantly escape the anti-EBV immune response.

Materials and Methods

Cell culture conditions

EBV-negative BL cell lines BL2 and BL41 and their EBV-positive counterparts, BL2B95.8 and BL41B95.8, as well as the lymphoblastoid

cell lines (LCLs) RUD and PRI and the atypical BL cell line P3HR1 were cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium (Life Technologies, BRL-Life Technologies Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% decompeted FCS (Clontech, Palo Alto, CA), 50 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Amino acids, vitamins, and pyruvate were added at supplier-recommended concentrations (all from Life Technologies, Carlsbad, CA). Samples from healthy subjects were obtained from the Centre de Ressources Biologiques of the University Hospital Center of Limoges after their informed consent. New CD19- and CD20-positive LCLs (C0401, J1209, and N2803) were established and characterized by Genethon (Evry, France). They were cultured in the same conditions as the other cell lines. The EREB2.5 latency III inducible cell line (15) was cultured in the same conditions with addition of β-estradiol (1 μM). All cell lines were mycoplasma free (MycAlert Mycoplasma Detection Kit; Lonza, Levallois, France).

Plasmid selection

Escherichia coli were transformed with luciferase (Luc), LMP1 wild type (LMP1-Wt), or LMP1CT PRT1 vectors (16, 17). Clones were selected, amplified in Luria-Bertani medium with ampicillin (100 ng/ml), and purified using the NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel). EREB2.5 cells were transfected (20 × 10⁶ cells for 20-μg vector in 500 μl of RPMI)

with the Gene Pulser II Bio-Rad system (250 V, 400 μ F) and selected with hygromycin (400 μ g/ μ l).

Flow cytometry

For surface labeling, 500,000 cells were labeled for 15 min in 50 μ l of PBS at room temperature in the dark. The different Abs and conjugated fluorochromes, as well as final dilutions are listed in Supplemental Table 1. Cells were washed in PBS and fixed in 300 μ l of PBS with 1% PFA. Intracellular FOXP3 and BMRFL1 labeling were performed using the IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Pasadena, CA), according to the protocol recommended by the supplier (after surface labeling for 45 min in the dark at room temperature for FOXP3). Acquisition was performed on BD Biosciences flow cytometers: FACSCalibur for B cell labeling, FACSaria III for Treg labeling and LSRFortessa for the proliferation assay. Results were analyzed with Kaluza V3.1 (Beckman Coulter) or CellQuest Software (Becton Dickinson). Mean fluorescence intensity ratios were calculated as the mean fluorescence intensity of the relevant Ab on its isotopic control.

Proliferation and T cell activation

Cells were incubated with Violet Proliferation Dye 450 (VPD450; BD Biosciences) for 15 min at 37°C. After two washes, cells were resuspended in culture medium in the different test conditions. T cells were activated using the T cell activation expansion kit (particles conjugated to CD2, CD3, and CD28 mAbs; Miltenyi Biotec, Paris, France), according to the manufacturer's protocol. After 5 d of culture, cells were washed, labeled with CD4-FITC and CD8-allophycocyanin-H7 mAbs for 15 min at room temperature, and analyzed by flow cytometry.

RNA extraction and real-time quantitative PCR

For RNA extraction, 10^6 cells were washed and resuspended in 500 μ l of TRIzol (Life Technologies). Total RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations. Total RNA (2 μ g) was retrotranscribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocol in 20 μ l of final reaction volume. Reverse transcription was performed for 10 min at 25°C, 2 h at 37°C, and 5 min at 85°C. Quantitative mRNA expression of *IL-10*, *TGF- β 1*, *EBI3*, *IL12A*, *PD-L1*, and *HPRT1* was performed in duplicate with 6 ng of cDNA using the TaqMan Assay On Demand Gene Expression system (reference Hs00961622-m1, Hs00820148-g1, Hs01057148-m1, Hs01073447, Hs01125301-m1, and Hs02800695-m1, respectively; Life Technologies) on an ABI PRISM 7000 automat. Forward (F) and reverse (R) sequences of primers were 5'-TGGAGCGTGCTTTGCTAGAG-3' and R-5'-GGCCTGGTCTCCGTA-GAAGAG-3' for *BNLF2A* (18) and 5'-GGACCTGAAGCCAAAGACCA-3' and R-5'-TCTCACACGGCAGGACCTG-3' for *BCRF1*. Each quantitative PCR was performed in triplicate. The Δ CT was calculated as the mRNA cycle threshold (CT), the *HPRT1* CT (Δ CT). The $\Delta\Delta$ CT was calculated as previously described (19). The calculated relative mRNA expression level was equal to $2^{-\Delta\Delta CT}$.

ELISA tests

To measure cytokine secretion (IL-10, TGF- β 1, IL-27, and IL-12), cells were cultured at 0.4×10^6 cells/ml for 48 h. Supernatants (50 ml) were concentrated by centrifugation ($4000 \times g$ for 30 min using Amicon Ultracel-10K [Millipore, Darmstadt, Deutschland]). ELISA tests were performed in triplicate following the manufacturer's instructions: (human IL-10, human latent TGF, human IL-27, human IL-12 (p70); BioLegend, San Diego, CA).

Negative immunoselection of peripheral T lymphocytes

Samples from healthy subjects were half diluted in RPMI 1640 complemented with 10% FCS. PBMCs were recovered after separation on lymphocyte medium separation (Eurobio, Les Ulis, France). After washing in PBS, cells were resuspended in 500 μ l of RPMI 1640 with a mixture of Abs against all PBMC subtypes except T cells (Human T Cell Isolation Kit; STEMCELL Technologies; Grenoble, France), following the kit's instruction. The purity of recovered T cells was confirmed during experiments (samples with T cells alone).

Blocking by anti-PD-L1 mAb

Assays were performed by incubation of LCL B cells with their autologous T cells (B cell/T cell [B/T] ratio = 4) for 48 h in the absence of or with 10 μ g/ml isotopic control (purified mouse IgG1, κ) or B7H1 blocking mAb (purified mouse mAb, clone MIH1; eBioscience).

Statistical analysis

Student *t* tests were performed with Excel Software.

Results

EBV latency III-transformed B cells display an immunoregulatory profile

To explore the immunoregulatory properties of the three new LCL EBV latency III-transformed B cells characterized by Genethon, we first looked at the transcriptional expression of two viral immunoevasins in EBV's lytic phase: *BCRF1* (which encode the viral homolog of IL-10, vIL10) and *BNLF2A* (involved in viral evasion from HLA class I-restricted T cell immunity). As shown in Supplemental Fig. 1, *BCRF1* was highly expressed only in the J1209 LCL when compared with the B95.8 EBV-producing cell line, and *BNLF2A* was found to be expressed at low levels. No relationship was found between *BCRF1* expression levels and the lytic cycle (assessed by expression of BMRFL1, a DNA polymerase processivity factor essential for lytic virus replication) (Supplemental Fig. 1).

Expression of IL-10 by both EBV latency III B cells and Bregs is well known. Two other immunosuppressive cytokines have been reported to be secreted by Bregs: TGF- β (an inducer of PD-1 on T cells and Tregs) and IL-35 (composed of two subunits: IL-12 α , encoded by the *EBI3* gene and IL-27- β , encoded by the *IL12A* gene). Expression of IL-10 and TGF- β 1, as well as expression of IL-35 subunits, was analyzed at the transcriptional level by reverse transcriptase quantitative PCR and at the secretory level in culture medium by ELISA on a series of five classical LCLs (the three C0401, J1209, and N2803 recently established LCLs plus two LCLs, established more than two decades ago (PRI and RUD) as well as two EBV-converted BL cell lines. As negative controls, we used the EBV-negative counterpart of EBV-converted BL cells, the P3HR1 cell line (EBNA2-negative, atypical EBV latency), as well as normal freshly isolated resting B cells (Fig. 1). As expected, all EBV latency III-transformed B cells expressed high levels of IL-10. Despite some variations between cell lines, all EBV-proliferating B cells (classical LCLs and EBV-converted BLs) also strongly overexpressed TGF- β 1 and the two constitutive subunits of IL-35 at both transcriptional and secretory levels

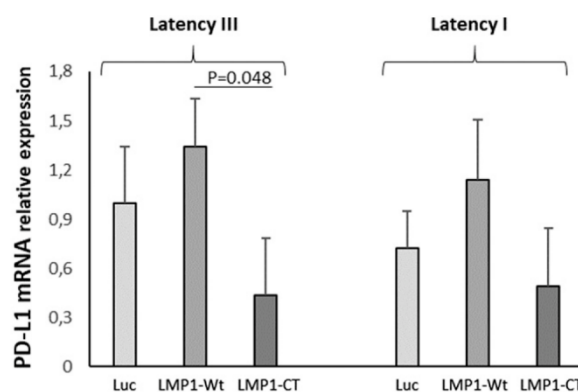


FIGURE 2. EBV latency I and latency III B cells overexpress PD-L1 in a LMP1-dependent manner. Transcriptional expression of *PD-L1* was studied in the EREB2-5 B cell line (latency I), which is inducible for the latency III program by addition of β -estradiol (1 μ M). Cells were stably transfected to express Luc, LMP1-Wt, or LMP1-CT (dominant negative of LMP1). In latency I or III, PD-L1 expression was positively correlated with that of LMP1-WT and negatively correlated with that of LMP1-CT. Each experiment was performed at least three times.

(Fig. 1A, 1B). As expected, EBV latency III-transformed B cells strongly expressed PD-L1 in comparison with controls (Fig. 1C). Expression of PD-L1 was also found on SCID tumors derived from either the three recent LCLs or the old LCL PRI (Supplemental Fig. 2).

EBV latency III-transformed B cells express PD-L1 in an LMP1-dependent manner

Transcriptome results suggested that PD-L1 expression during EBV latency III/proliferation program was mainly due to LMP1, the main EBV oncogene (unpublished data and ([20]). To confirm this result, the EREB2-5 cell line, an EBV latency III cell line that is estradiol conditional for EBNA2 activity (essential for the

initiation of the latency III program expression) (21) was stably transfected with the doxycycline-regulatable PRT1 vector in which the cassette was a cDNA coding for either Luc, LMP1-Wt, or a dominant negative variant of LMP1, LMP1-CT (22). The simultaneous expression of the NGFRt cDNA by the PRT1 vector allowed selection of transfected cells. As shown in Fig. 2, estradiol withdrawal (resting cells expressing EBNA1 [i.e., latency I state]) decreased expression of PD-L1 (Fig. 2). Even if not statistically significant compared with the Luc assay, overexpression of LMP1-Wt increased PD-L1 expression either in the latency III or latency I state, whereas inhibition of LMP1 signaling by LMP1-CT decreased its expression. This is in agreement with the fact that PD-L1 expression was dependent of LMP1 presence. Additionally, we

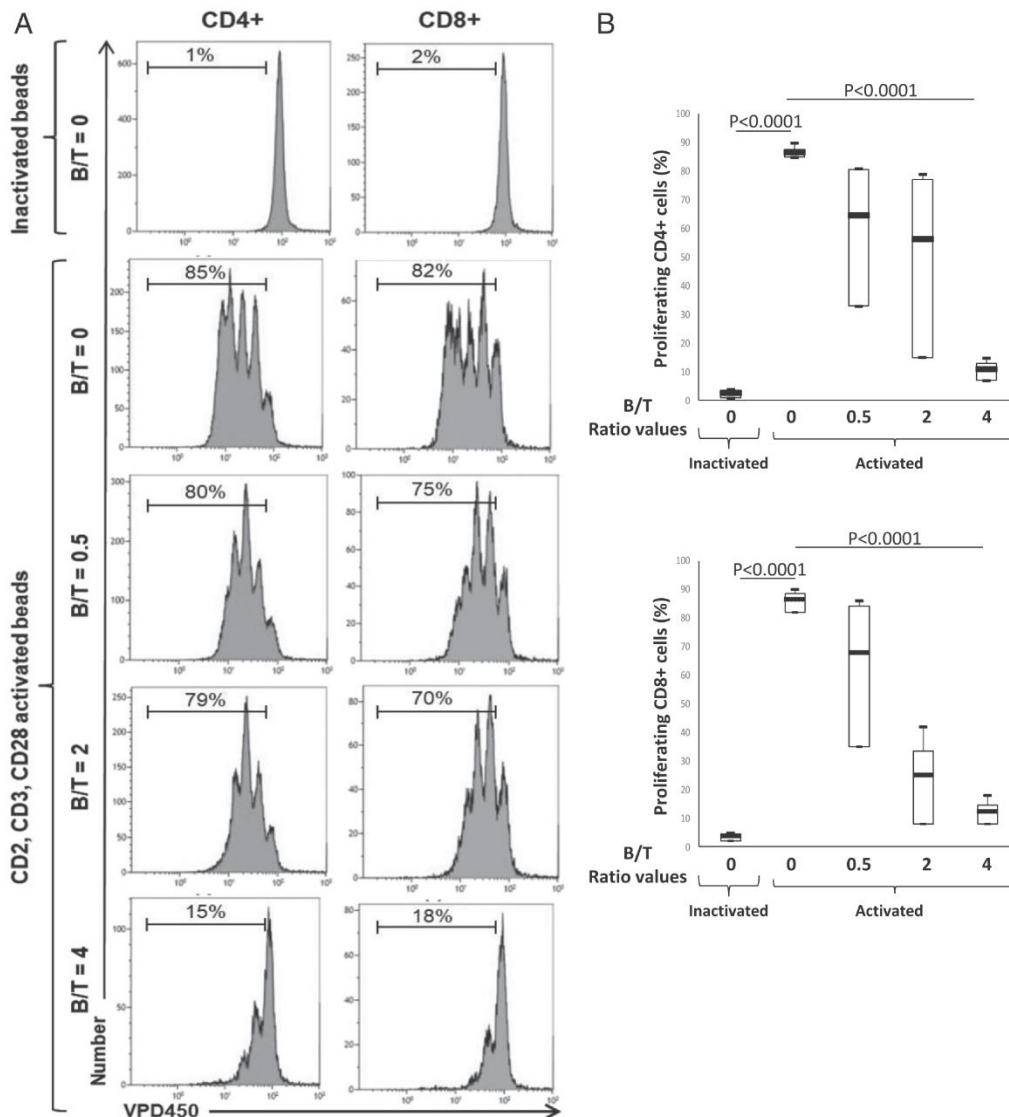


FIGURE 3. Autologous EBV latency III B cells inhibit proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Freshly isolated T cells were labeled with the VPD450 dye and incubated with either a mixture of beads coated with CD2, CD3, and CD28 mAbs (activated beads) or with inactivated beads in the absence of or with autologous EBV latency III B cells at B/T ranging from 0 to 4 on day five. Cells were labeled with anti-human CD4-FITC and anti-human CD8-allophycocyanin-H7 mAbs and analyzed by flow cytometry. **(A)** Examples of VPD450 fluorescence monoparametric histograms for CD4 and CD8 T cells. Each experimental condition is indicated at the left of the panel. Results show decreased proliferation of both CD4 and CD8 T cells in the presence of their cognate EBV latency III B cells (J1209). **(B)** Results for three different healthy subjects for CD4⁺ (upper panel) and CD8⁺ (lower panel) T cells. Altogether, results show decreased proliferation of both CD4 and CD8 T cells in presence of their cognate EBV latency III B cells.

looked at gene expression of *IL-10*, *TGF- β* , *EBI3*, and *IL-12A* and found that, although both *IL-10* and *EBI3* were induced by the latency III program, only *EBI3* was under the dependence of LMP1 in this cellular model (Supplemental Fig. 3).

EBV latency III-transformed B cells inhibit proliferation of their autologous T cells

To determine whether EBV latency III-transformed B cells have immunoregulatory functions like Bregs, we assessed the ability of three (C0401, J1209, and N2803) recently established independent LCL cell lines to repress autologous T cell proliferation. T cells were stimulated or not with a mixture of beads coated with anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 agonist mAbs (CD2/CD3/CD28 mixture), which mimics T cell stimulation by APCs (23) in the presence of their cognate EBV-proliferating B cells (B/T ratios ranging from 0 to 4). As expected, the anti-CD2/-CD3/-CD28 mixture strongly stimulated T cell proliferation (Fig. 3). At a B/T ratio between 0.5 and 2, proliferation of autologous CD4 and CD8 T cells was moderately and heterogeneously inhibited but with fewer proliferation cycles (Fig. 3). At a B/T ratio of 4, all three LCLs almost completely blocked proliferation of their autologous CD2/-CD3/-CD28-activated T cells. This inhibition of proliferation was comparable for both CD4 and CD8 T cells (Fig. 3B).

One of the major immunosuppressive mechanisms of Bregs is to favor Treg expansion. Various Treg subtypes have been described. In the view of possible expansion of Tregs, we compared the effect of EBV latency III LCLs on whole CD3⁺ T cells and

their cognate-purified CD8⁺ T cells. Consistently with Fig. 3, EBV latency III LCLs repressed proliferation of whole cognate CD3⁺ T cells (Fig. 4A). By contrast, no inhibitory effect was seen when purified CD8⁺ T cells were cocultured with their cognate EBV latency III LCLs. On the contrary, the number of proliferation cycles was increased and, even if not statistically significant, the proliferation rate tended to be higher (Fig. 4B). This result indicates that EBV latency III LCLs kept a very strong activation power on their cognate CD8⁺ T cells and suggests that the inhibitory effect could be ascribed to CD4 T cells.

EBV latency III-transformed B cells promote expansion of both cTregs and uTregs

Tregs can be separated into two main subsets, those that are CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ cTregs and those that are CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁻ uTregs. Expression of FOXP3 and CD25 is shared by both cTregs and activated T cells. Indeed, 48-h activation of freshly isolated primary T cells with anti-CD2/-CD3/-CD28 mixture resulted in coexpression of both FOXP3 and CD25 on CD4⁺ T cells, CD25 being highly induced (Fig. 5A, 5B). Coincubation of CD3⁺ T cells with their cognate LCLs led also to expansion of CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ T cells. But this expansion was moderate, and the expression pattern of FOXP3 and CD25 on these cells was different from activated T cells. Moreover, a significant expansion of CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁻ T cells was seen (Fig. 5C, 5D). These CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁻ T cells were almost absent from CD2/-CD3/-CD28-activated T cells (compare

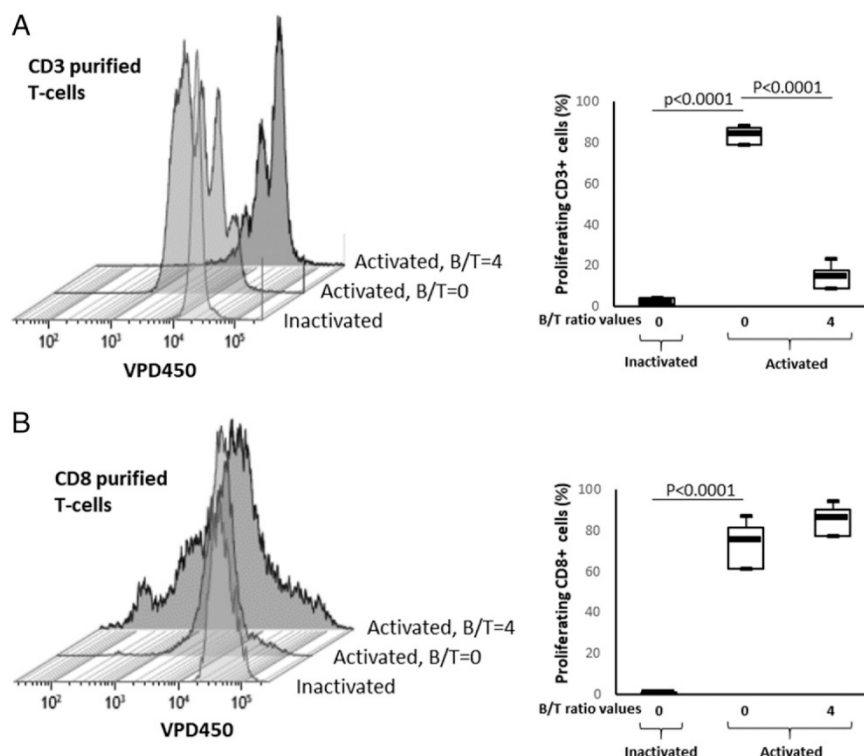


FIGURE 4. EBV latency III B cells induce proliferation of isolated CD8⁺ T cells. Freshly isolated CD3⁺ or CD8⁺ T cells were labeled with the VPD450 dye and incubated with either a mixture of beads coated with CD2, CD3, and CD28 mAbs (activated beads) or with inactivated beads in the absence of or with autologous EBV latency III B cells (B/T = 4) on day five. Cells were analyzed by flow cytometry. **(A)** Examples of VPD450 fluorescence monoparametric histograms for CD3 T cells and results for three healthy subjects. **(B)** Examples of VPD450 fluorescence monoparametric histograms for CD8 T cells and results for three healthy subjects. Altogether, these results show that EBV latency III B cells decreased proliferation of cognate CD3 T cells as a whole, whereas EBV latency III B cells induce proliferation of isolated CD8⁺ T cells.

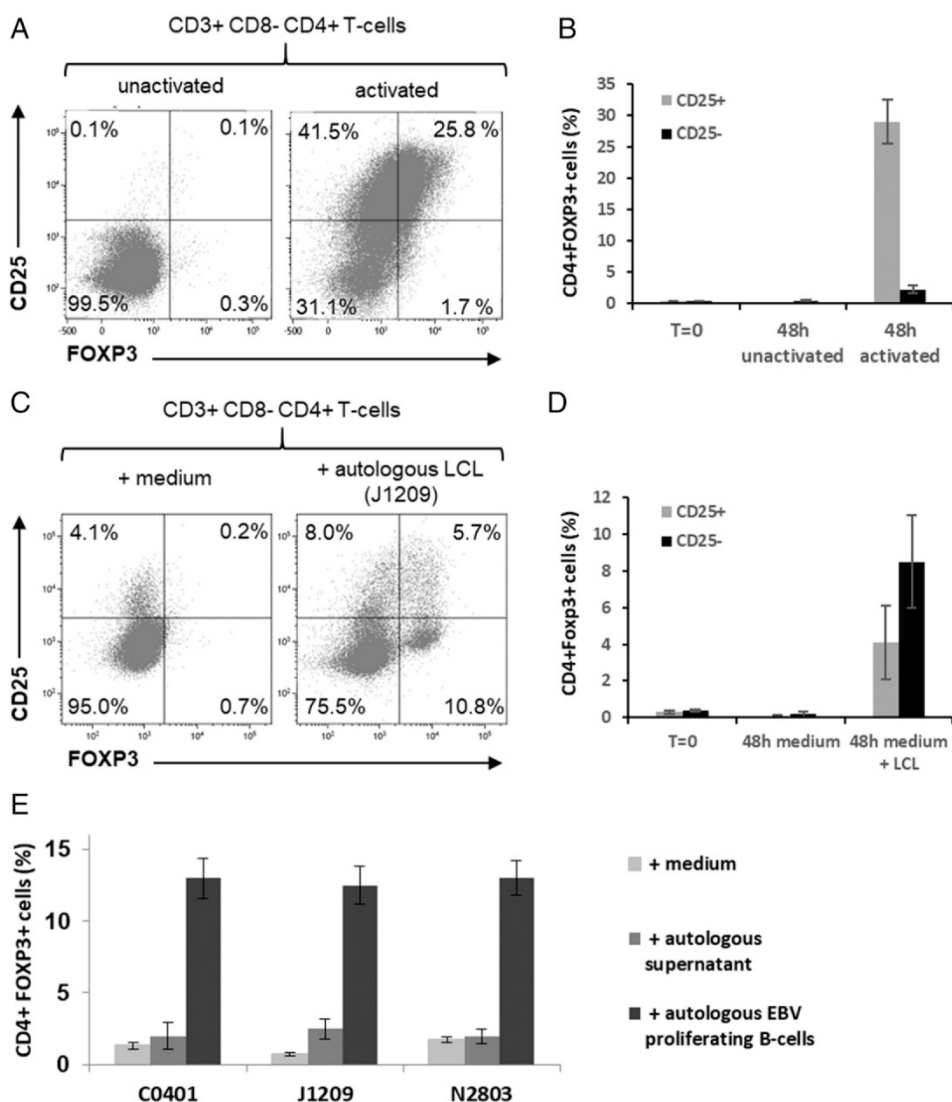


FIGURE 5. Treg expansion by autologous EBV latency III B cells. (A and B) T cells from healthy donors were incubated with either a mixture of beads coated with CD2, CD3, and CD28 mAbs (activated beads) or with inactivated beads during 48 h. Cells were analyzed by flow cytometry. (A) Examples of FOXP3/CD25 fluorescence cytograms and (B) results for three healthy subjects. (C–E) T cells from healthy donors were incubated with culture medium (negative control) or supernatant containing or not cells of cognate autologous EBV latency III B cell lines (B/T = 4). After 48 h incubation, cells were labeled with the CD3-V500, CD4-FITC, CD8-allophycocyanin-H7, CD25-BV421, and FOXP3-PE panel and analyzed by flow cytometry for each experimental condition indicated in the legend. (C) Examples of FOXP3/CD25 fluorescence cytograms and (D and E) results for three different healthy subjects. These results show induction of FOXP3⁺, mainly CD25⁻ CD4⁺ T cells after coculture with cognate EBV latency III B cells.

Fig. 5A–D). Expansion of both CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ and CD25⁻ T cells was hardly induced in the presence of autologous supernatants alone (Fig. 5E). Altogether, these results suggest that EBV latency III LCLs were able to induce expansion uTregs mainly and cTregs weakly and that expansion is likely to be due to B/T contact.

According to Zhou and colleagues (24), bona fide CD4⁺ FOXP3⁺ Tregs also express increased membrane CD39 levels. We thus evaluated FOXP3 expression on T cells induced by contact with EBV latency III B cells, according to their CD39 expression. As shown in Fig. 6, CD4⁺ T cells could be separated into three subsets according to CD39 expression: CD39⁻, CD39^{weak}, and CD39^{high} (Fig. 6A). FOXP3 expression was high in CD4⁺ CD39^{high} T cells, weak in CD4⁺ CD39^{weak} T cells, and negative on

CD39⁻ T cells (Fig. 6B). Gating on CD4⁺ CD39^{high} T cells showed that most of them were FOXP3⁺ CD25⁻, whereas some were FOXP3⁺ CD25⁺ (Fig. 6C). Moreover, expansion of both CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ CD39^{high} FOXP3⁺ T cells varied in the same manner as the ratio between EBV latency III B cells/autologous T cells (Fig. 6D). Tregs are also known to express CTLA4, IKZF2 (Helios), TNFRSF18 (GITR), and LAG3 molecules (25). These molecules were highly expressed by both CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ CD39^{high} T cells (Fig. 7). Thus, EBV latency III LCLs appeared to induce expansion of both cTreg and uTreg compartments.

To assess whether EBV latency III-induced Tregs were functional, we tested the expression of both latency-associated peptide (LAP) (a propeptide that remains associated with mature TGF- β) and PD-1 on CD39^{high} cTreg and uTreg subsets.

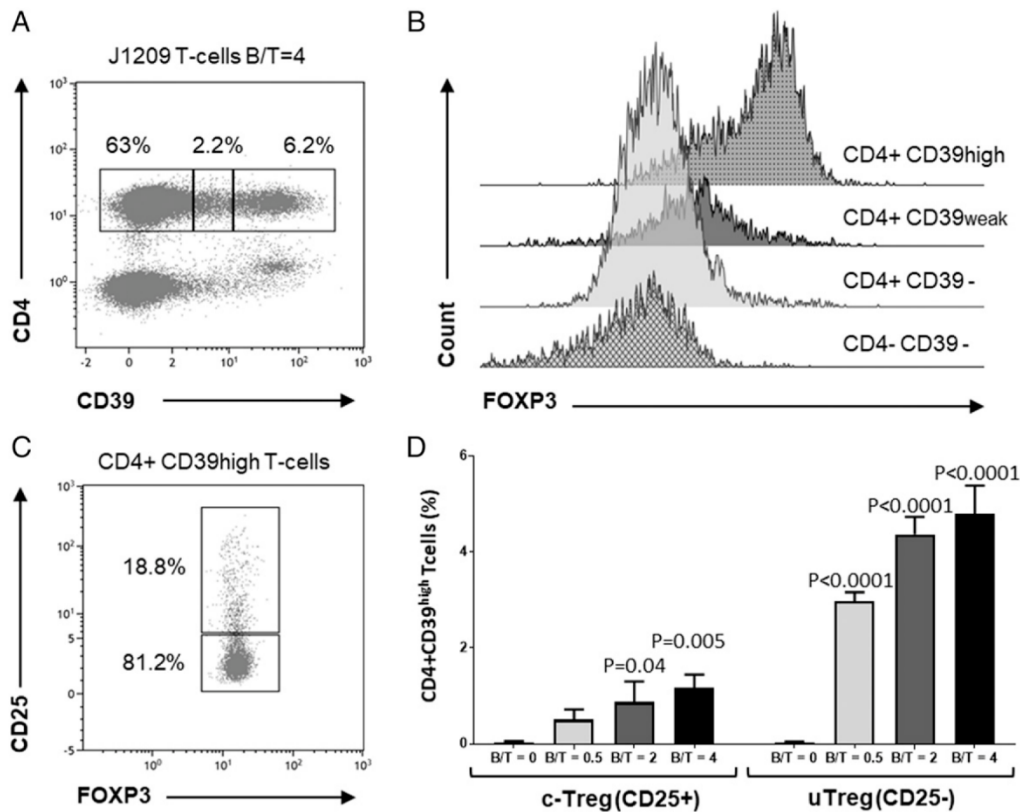


FIGURE 6. cTregs and uTregs express both the FOXP3 and the CD39 key markers of Tregs. T cells from healthy donors were incubated with their cognate autologous EBV latency III B cell line (J1209) at a B/T ratio varying from 0 to 4. After 48 h incubation, cells were labeled with the CD39-V500, CD4-FITC, CD25-BV421, CD-39-allophycocyanin, and FOXP3-PE panel and analyzed by flow cytometry. **(A)** Example of CD4⁺ T cell distribution according to CD39 expression. Cells were analyzed on a CD39/CD4 biparametric histogram gated on CD3⁺ T cells. Three subpopulations were defined: CD39⁻, CD39^{weak}, and CD39^{high}. **(B)** Histograms of FOXP3 expression according to CD39 expression. CD4⁻ CD39⁻ T cells (corresponding to CD8⁺ CD39⁻ T cells) were used as a negative control. CD39 and FOXP3 were clearly coexpressed. **(C)** Example of CD25 expression for FOXP3⁺ CD39^{high} T cells. Cells were analyzed on a FOXP3/CD25 biparametric histogram gated on CD4⁺ CD39^{high} T cells. Among FOXP3⁺ CD39^{high} Tregs, the majority of cells were CD25⁻ (uTregs), whereas some CD25⁺ cTregs were also induced. **(D)** Histograms showing the percentage of CD4⁺ CD39^{high}, CD25⁻, or CD25⁺ T cells for increasing B/T ratios (ranging from 0 to 4). Number of both Treg subsets increased with B/T ratio; CD25⁻ cells still remained the majority. Each experiment was performed at least three times.

CD8⁺ T cells were used as an internal control. Coincubation of EBV latency III B cells and autologous T cells induced moderate LAP expression on uTregs, (Fig. 8). PD-1 expression was found on uTregs even in the absence of EBV latency III B cells and was not influenced by addition of cognate B cells. This suggests that uTregs were constitutively but moderately active. By contrast, expression of both LAP and PD-1 was strongly induced on cTregs in a dose-dependent manner after coincubation with EBV latency III B cells. This shows that cTreg became strongly active in an inducible manner after coincubation with their cognate EBV latency III B cells.

Expansion of Tregs upon EBV latency III-transformed B cells depends on PD-L1

Because PD-1 was expressed on both cTregs and uTregs and EBV latency III B cells strongly expressed PD-L1, we next examined whether PD-L1 could play a role in the induction of CD4⁺ FOXP3⁺ T cell expansion by EBV-proliferating B cells. In fact, PD-1 expression was significantly increased after induction of proliferation by the anti-CD2/-CD3/-CD28 mixture, and even more so in the presence of autologous EBV-proliferating B cells (Fig. 9A, 9B). Furthermore, autologous T cells were incubated with either

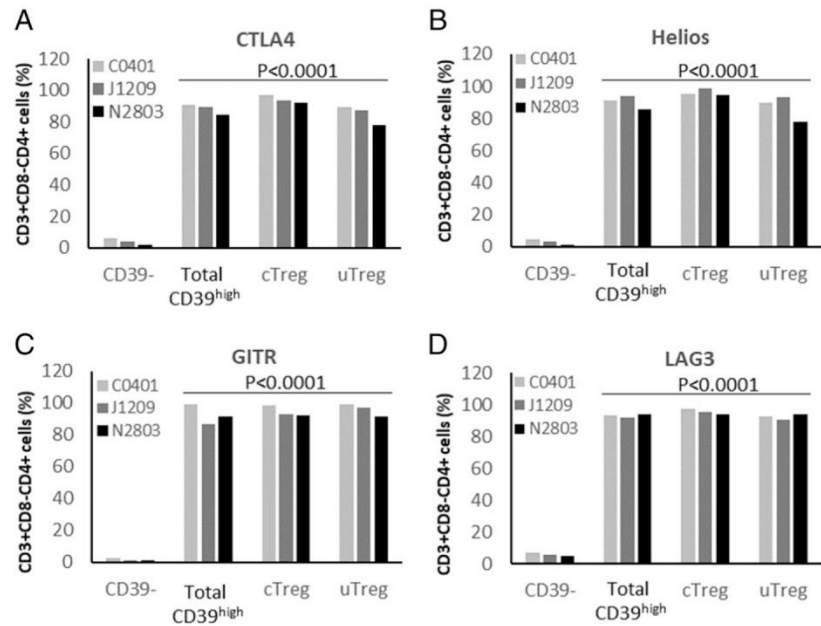
culture medium, an isotypic control, or a blocking anti-PD-L1 mAb in the presence or not of their cognate EBV latency III-infected B cells. Compared with culture medium, the isotypic control did not, or only very weakly, affect expansion by EBV-proliferating B cells, whereas CD4⁺ FOXP3⁺ T cell expansion was dramatically decreased in the presence of anti-PD-L1 blocking Ab (Fig. 9C, 9D), reaching levels close to those of supernatants alone (Fig. 5E). This result emphasizes that cTreg and uTreg expansion strongly depends on PD-L1 expression on LCLs.

Discussion

In this study, we demonstrated that EBV-proliferating B cells exhibited strong immunoregulatory properties. They were able to repress proliferation of their cognate-activated T cells, express immunosuppressive cytokines and PD-L1 due to LMP1, and promote expansion of both cTregs and uTregs in a PD-L1-dependent manner.

The ability of some B cells to moderate the immune response has been ascribed to a particular subset, the Bregs. Bregs were first described as a specific B cell subset that moderates chronic inflammation in bowel disease in mice (26). Then they were described in humans some years later (27). Breg immunoregulatory

FIGURE 7. Both cTregs and uTregs express key markers of Tregs. T cells from healthy donors were incubated with their cognate autologous EBV latency III B cell line at a B/T ratio = 4. After 48 h incubation, cells were labeled with the CD3-V500, CD4-FITC, CD8-allophycocyanin-H7, CD25-BV421, CD-39-allophycocyanin, and CTLA4, Hélios, GITR, or LAG3-PE panel and analyzed by flow cytometry. The percentage of CD3⁺ CD4⁺ T cells expressing (A) CTLA4, (B) Hélios, (C) GITR, and (D) LAG3 among CD39⁻, CD39^{high} (CD25⁺ or CD25⁻), CD39^{high} CD25⁺ (cTreg) and CD39^{high} CD25⁻ (uTreg) subpopulation was analyzed for three healthy subjects. The four markers were significantly overexpressed comparatively to CD39⁻ T cells.



properties are related to their ability to secrete immunosuppressive cytokines, mainly IL-10 (28) but also TGF- β (9, 29) and IL-35 (30). Taking into account the cytokine expression profile and the immunoregulatory functional properties, different immunophenotypic characteristics have been reported. A consensus on Breg properties and phenotype was published in 2015 (10). From this, it appeared that common characteristics of all Breg subsets are to repress proliferation of autologous T cells and to secrete IL-10. Bregs may also have the ability to orient T cell fate toward Treg expansion (29) From our results, it appears that strong similarities exist between EBV latency III-transformed B cells and Bregs.

CD39 expression is primarily expressed by immune-suppressive FOXP3⁺ Tregs (24, 31). FOXP3/CD39 coexpression has been reported on Tregs from patients with chronic infections such as coinfection by HIV and tuberculosis (32) or was correlated with the progression of HBV infection (33). This suggests some common features between persistent viral chronic infections. In this paper, we showed that EBV latency III B cells induced expansion of CD4 T cells that coexpressed both FOXP3 and CD39, strengthening the fact that EBV latency III B cells, like Bregs, were able to bias T cell fate toward Treg differentiation pathway.

EBV-proliferating B cells are highly immunogenic (34) and prone to CD95-induced apoptosis by cognate T cells (35). EBV

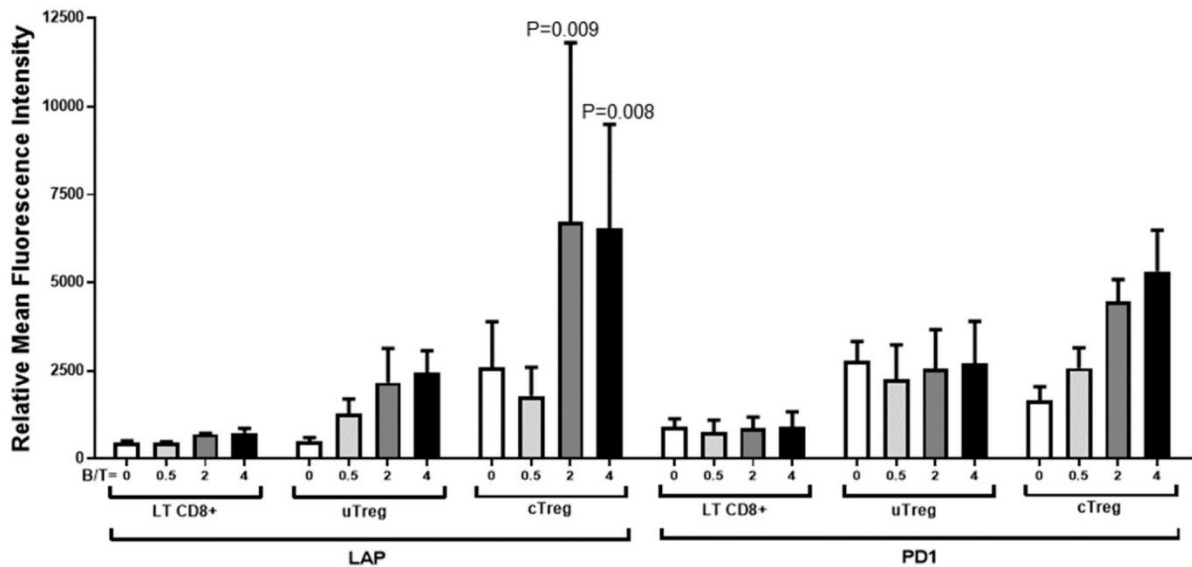


FIGURE 8. cTregs and uTregs express the inhibitory functional markers LAP and PD-1. T cells from healthy donors were incubated with their cognate autologous EBV latency III B cell line (C0401, J1209, N2803) at a B/T ratio varying from 0 to 4. After 48 h incubation, cells were labeled with the CD3-V500, CD4-FITC, CD8-allophycocyanin-H7, CD25-BV421, CD39-allophycocyanin, and PD-1-PE or LAP-PE panel. Cells were analyzed by flow cytometry. CD8⁺ CD39⁻ cells were used as an internal control. LAP and PD-1 were increased on both uTregs and cTregs. Each experiment was performed at least three times.

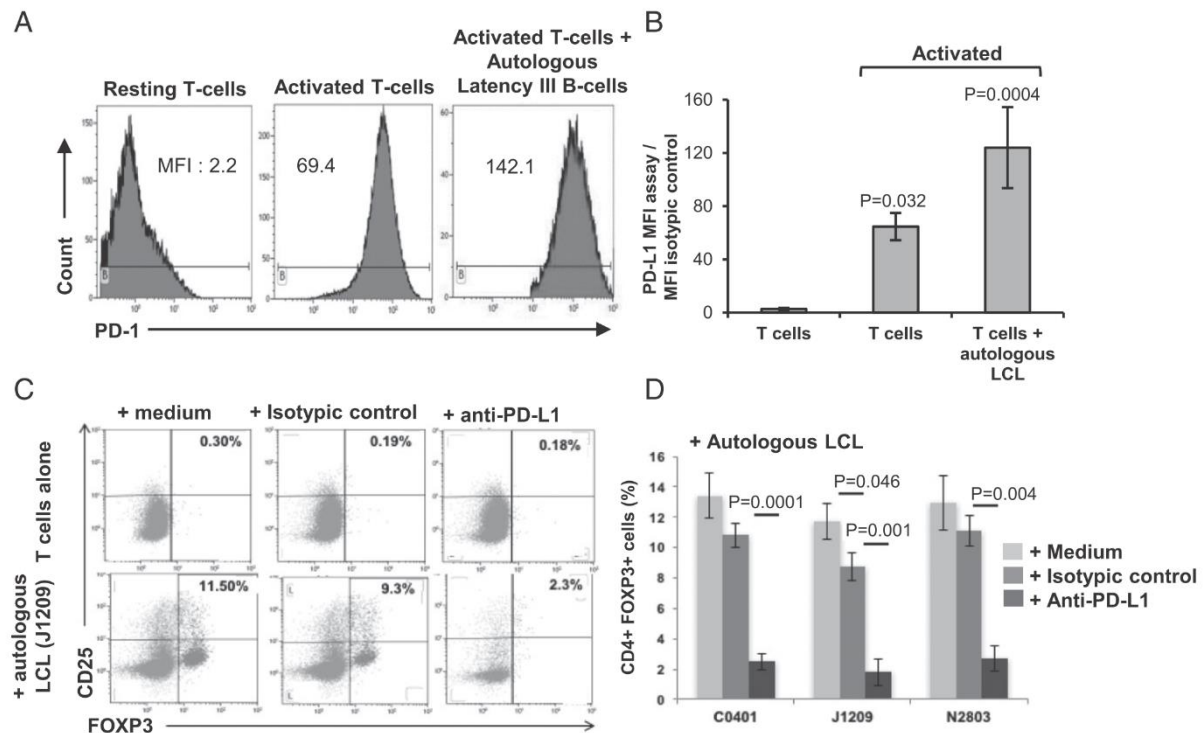


FIGURE 9. Inhibition of PD-L1–repressed Treg expansion induced by EBV latency III autologous B cells. **(A)** A representative example of PD-1 overexpression on T cells after CD2, CD3, and CD28 activation or in presence of cognate EBV latency III B cells J1209 (B/T = 4) compared with resting T cells. Monoparametric histograms of PD-1 expression were gated on CD4⁺ T cells by flow cytometry. **(B)** Histogram showing PD-1 expression for each experimental condition. Each experiment was performed on three different LCLs. **(C)** Example of FOXP3/CD25 biparametric histograms gated on CD4⁺ T cell after 48 h coculture of T cells in presence or not of their cognate autologous EBV latency III B cells with either medium alone, isotypic control, or anti-PD-L1–blocking mAb. **(D)** Histogram showing levels of CD4⁺ FOXP3⁺ T cells in each experimental condition for three healthy donors after 48 h incubation with autologous EBV latency III B cells. Blocking PD-L1 resulted in repression of FOXP3⁺ T cell expansion.

latency III–immortalized B cells express high levels of IL-10, TGF- β 1, IL-35, and PD-L1. Filtered cell supernatant from EBV-proliferating B cells marginally induced expansion of FOXP3-positive T cells, suggesting the requirement of a direct cell–cell contact. Nevertheless, it cannot be excluded that this effect was also related to release of exosomes from EBV-infected B cells. Indeed, Wada and colleagues (36) have shown that exosomes from malignant effusions could carry LAP-TGF- β that drive expansion of Tregs. In this study, we found that high levels of surface PD-L1 were under the dependence of LMP1. This result in latency III–transformed B cells is consistent with results reported on EBV-related NK/T lymphomas (37). Induction of Treg expansion by EBV latency III–transformed B cells was under the dependence of at least the PD-1/PD-L1 axis. PD-L1 moderates autologous cytotoxicity of CD8 T cells against these EBV-immortalized B cells (4). PD-L1 expression is deregulated in numerous cancers, including EBV-negative lymphomas (38, 39). PD-L1 dysregulation may be related to structural rearrangements of chromosome 9 in diffuse B cell non-HLs (40), a very strong genetic indication that tumor selection pressure favors transformed cells that are able to escape from immune surveillance. Increased PD-L1 expression is also found in EBV-negative or -positive HLs (41, 42). In breast cancer, PD-L1 expression is associated with poor patient prognosis (43). Expression of this immune checkpoint is associated with Tregs within the tumor for breast cancers. Several studies have reported that the PD-1/PD-L1 axis is implicated in the differentiation of Th1 cells into Tregs (44). Presence of intratumoral Tregs correlates with

a poor prognosis for breast cancer (45). Immunotherapies targeting the PD-1/PD-L1 axis have proven to be effective for treatment of this cancer (46). The fact that expansion of Tregs by EBV latency III B cells depends on PD-L1 suggests a major role for this molecule in EBV immune escape.

Altogether, our results demonstrate that EBV-proliferating B cells have major intrinsic immunosuppressive properties, with a major role for PD-L1 in the induction of both uTregs and cTregs. Even if it has been largely demonstrated that the EBV burden is under the strict control of the host immune system, these results give clues to reasons why EBV-proliferating B cells are not definitively eliminated as for other viruses responsible for chronic infections, such as hepatitis B virus (47). These results could also shed some light on the reasons why EBV-positive DLBCLs occur on a more fragile background, such as in elderly patients, who are known to have an increased pool of Tregs (48) and decreased capacities to elaborate immune protection when vaccinated (49). Because of continuous NF- κ B activation, either related to LMP1 expression for EBV or to mutations in the NF- κ B–activating track for activated B cell–DLBCLs, both EBV-proliferating B cells and activated B cell–DLBCLs are phenotypically closed. Kiyasu and collaborators (50) showed the role of PD-L1 dysregulation in DLBCLs, which is correlated with poor prognosis. Our results raise the question whether these poor prognosis, aggressive B cell lymphomas could also mimic Tregs by modifying their immune microenvironment through, for example, secretion of immunosuppressive cytokines or promoting expansion of FOXP3⁺ Tregs.

Acknowledgments

We thank the Cytométrie et Imagerie platform for flow cytometry of the CNRS Research Federation 3503 (GEIST Institute) and Dr. Jeanne Cook-Moreau for careful English editing.

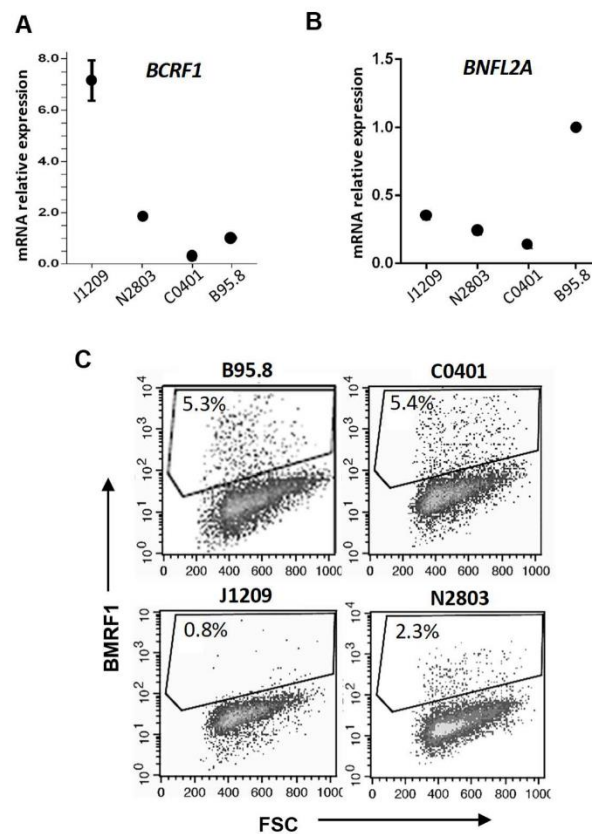
Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

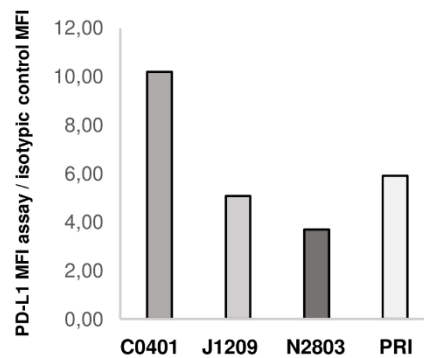
- Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley. 2007. *Fields Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Basgoz, N., and J. K. Preiksaitis. 1995. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 9: 901–923.
- Ambinder, R. F. 2001. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur. J. Cancer* 37: 1209–1216.
- Durand-Panteix, S., M. Farhat, I. Youyouz-Marfak, P. Rouaud, C. Ouk-Martin, A. David, N. Faumont, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 2012. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J. Immunol.* 189: 181–190.
- Goodman, A., S. P. Patel, and R. Kurzrock. 2017. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14: 203–220.
- Sarris, A. H., K. O. Kliche, P. Pethambaram, A. Preti, S. Tucker, C. Jackow, O. Messina, W. Pugh, F. B. Hagemeister, P. McLaughlin, et al. 1999. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann. Oncol.* 10: 433–440.
- Taga, H., K. Taga, F. Wang, J. Chretien, and G. Tosato. 1995. Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 171: 1347–1350.
- Itoh, K., and S. Hirohata. 1995. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol.* 154: 4341–4350.
- Rosser, E. C., and C. Mauri. 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42: 607–612.
- Mauri, C., and M. Menon. 2015. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* 27: 479–486.
- He, Y., H. Qian, Y. Liu, L. Duan, Y. Li, and G. Shi. 2014. The roles of regulatory B cells in cancer. *J. Immunol. Res.* 2014: 215471.
- Fillatreau, S. 2016. Regulatory roles of B cells in infectious diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34(Suppl. 98): 1–5.
- Ray, A., and B. N. Dittel. 2017. Mechanisms of regulatory B cell function in autoimmune and inflammatory diseases through IL-10. *J. Clin. Med.* 6.
- Rincón-Arévalo, H., C. C. Sanchez-Parra, D. Castañón, L. Yassin, and G. Vásquez. 2016. Regulatory B cells and mechanisms. *Int. Rev. Immunol.* 35: 156–176.
- Kempkes, B., M. Pawlita, U. Zimmer-Strobl, G. Eissner, G. Laux, and G. W. Bornkamm. 1995. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology* 214: 675–679.
- Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, J.-M. Bechet, G. Laux, J. Bachl, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Hölzel, A. Malamoussi, et al. 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res.* 33: e137.
- Le Cloennec, C., T.-S. Ouk, I. Youyouz-Marfak, S. Panteix, C.-C. Martin, J. Rastelli, E. Adriaenssens, U. Zimmer-Strobl, J. Coll, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J. Virol.* 82: 6721–6733.
- Quinn, L. L., J. Zuo, R. J. M. Abbott, C. Shannon-Lowe, R. J. Tierney, A. D. Hislop, and M. Rowe. 2014. Cooperation between Epstein-Barr virus immune evasion proteins spreads protection from CD8+ T cell recognition across all three phases of the lytic cycle. *PLoS Pathog.* 10: e1004322.
- Gabert, J., E. Beillard, V. H. J. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J. M. Cayuela, H. Cavé, et al. 2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17: 2318–2357.
- David, A., N. Amaud, M. Fradet, H. Lascaux, C. Ouk-Martin, N. Gachard, U. Zimmer-Strobl, J. Feuillard, and N. Faumont. 2017. c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor-κB activated B cells. *Haematologica* 102: 883–894.
- Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Dürr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt. 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J.* 14: 88–96.
- Adriaenssens, E., A. Mougé, G. Goormachtigh, E. Loing, V. Fafeur, C. Auriault, and J. Coll. 2004. A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. [Published erratum appears in 2004 *Oncogene* 23: 8184.] *Oncogene* 23: 2681–2693.
- Chen, L., and D. B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. [Published erratum appears in 2013 *Nat. Rev. Immunol.* 13: 542.] *Nat. Rev. Immunol.* 13: 227–242.
- Zhou, Q., J. Yan, P. Putheti, Y. Wu, X. Sun, V. Toxavidis, J. Tigges, N. Kassam, K. Enjiyoji, S. C. Robson, et al. 2009. Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am. J. Transplant.* 9: 2303–2311.
- Huang, H., Y. Ma, W. Dawicki, X. Zhang, and J. R. Gordon. 2013. Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen. *J. Immunol.* 191: 1136–1143.
- Mizoguchi, E., A. Mizoguchi, F. I. Preffer, and A. K. Bhan. 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* 12: 597–605.
- Bouaziz, J.-D., K. Yanaba, and T. F. Tedder. 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224: 201–214.
- Blair, P. A., L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 32: 129–140.
- Lee, K. M., R. T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M. M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, et al. 2014. TGF-β-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 44: 1728–1736.
- Egwuagu, C. E., and C.-R. Yu. 2015. Interleukin 35-producing B cells (i35-Breg): a new mediator of regulatory B-cell functions in CNS autoimmune diseases. *Crit. Rev. Immunol.* 35: 49–57.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Höpner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, et al. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225–1232.
- Angerami, M. T., G. V. Suarez, M. B. Vecchione, N. Laufer, D. Ameri, G. Ben, H. Perez, O. Sued, H. Salomón, and M. F. Quiroga. 2017. Expansion of CD25-negative forkhead box P3-positive T cells during HIV and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front. Immunol.* 8: 528.
- Tang, Y., L. Jiang, Y. Zheng, B. Ni, and Y. Wu. 2012. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.* 13: 17.
- Tse, E., and Y.-L. Kwong. 2015. Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp. Mol. Med.* 47: e136.
- Le Cloennec, C., I. Youyouz-Marfak, E. Adriaenssens, J. Coll, G. W. Bornkamm, and J. Feuillard. 2006. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-κappaB, STAT1, and p53. *Blood* 107: 2070–2078.
- Wada, J., H. Onishi, H. Suzuki, A. Yamasaki, S. Nagai, T. Morisaki, and M. Katano. 2010. Surface-bound TGF-beta1 on effusion-derived exosomes participates in maintenance of number and suppressive function of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res.* 30: 3747–3757.
- Bi, X. W., H. Wang, W. W. Zhang, J. H. Wang, W. J. Liu, Z. J. Xia, H. Q. Huang, W. Q. Jiang, Y. J. Zhang, and L. Wang. 2016. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF-κB pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* 9: 109.
- Gatalica, Z., N. Bilalovic, S. Vranic, D. Arguello, S. Reddy, and N. Ghosh. 2015. PD-L1 and PD1 expression in lymphomas. *Blood* 126: 3899.
- Xing, W., K. Dresser, R. Zhang, A. M. Evens, H. Yu, B. A. Woda, and B. J. Chen. 2016. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget* 7: 59976–59986.
- Chong, L. C., D. D. W. Twa, A. Mottok, S. Ben-Neriah, B. W. Woolcock, Y. Zhao, K. J. Savage, M. A. Marra, D. W. Scott, R. D. Gascoyne, et al. 2016. Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 128: 1206–1213.
- Chen, B. J., B. Chapuy, J. Ouyang, H. H. Sun, M. G. Roemer, M. L. Xu, H. Yu, C. D. Fletcher, G. J. Freeman, M. A. Shipp, and S. J. Rodig. 2013. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin. Cancer Res.* 19: 3462–3473.
- Paydas, S., E. Bağır, G. Seydaoglu, V. Ercolak, and M. Ergin. 2015. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. *Ann. Hematol.* 94: 1545–1552.
- Zhang, M., H. Sun, S. Zhao, Y. Wang, H. Pu, Y. Wang, and Q. Zhang. 2017. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8: 31347–31354.
- Amarnath, S., C. W. Mangus, J. C. M. Wang, F. Wei, A. He, V. Kapoor, J. E. Foley, P. R. Massey, T. C. Felizardo, J. L. Riley, et al. 2011. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 3: 111ra120.
- Li, Z., P. Dong, M. Ren, Y. Song, X. Qian, Y. Yang, S. Li, X. Zhang, and F. Liu. 2016. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. *J. Cancer* 7: 784–793.
- Galanina, N., J. Kline, and M. R. Bishop. 2017. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Ther. Adv. Hematol.* 8: 81–90.
- Rosenberg, W. 1999. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 44: 759–764.
- Chang, C., S.-Y. Wu, Y.-W. Kang, K.-P. Lin, T.-Y. Chen, L. J. Medeiros, and K.-C. Chang. 2015. High levels of regulatory T cells in blood are a poor prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 144: 935–944.
- Nastoupil, L. J., R. Sinha, and C. R. Flowers. 2012. Management strategies for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Eur. Oncol. Haematol.* 8: 123–126.
- Kiyasu, J., H. Miyoshi, A. Hirata, F. Arakawa, A. Ichikawa, D. Niino, Y. Sugita, Y. Yufu, I. Choi, Y. Abe, et al. 2015. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 126: 2193–2201.

Supplementary figure 1:



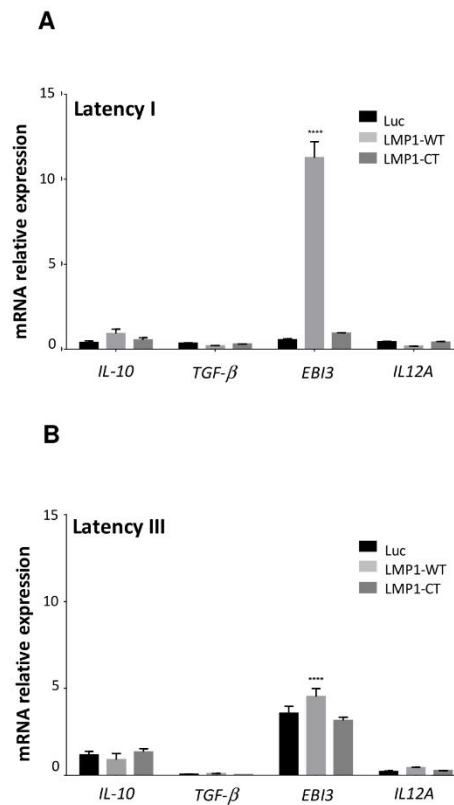
Supplementary Figure 1. Immunoregulatory properties of the new EBV latency III-transformed B cells according to the EBV's lytic phase. Transcriptional expression of the two immunoevasins (A) *BCRF1* (which encode the viral homologue of IL-10, vIL10) and (B) *NLF2A* (an inhibitor of the transporter associated with antigen processing, TAP) was studied with the B95.8 EBV producing cell line as reference. (C) Expression of BMRF1 (a polymerase processivity factor for lytic virus replication) was analyzed at the protein level by flow cytometry. *BCRF1* was only highly expressed by the J1209 LCL without any relationship with the lytic cycle.

Supplementary figure 2:



Supplementary Figure 2. SCID tumors derived from EBV latency III B-cells overexpress PD-L1. SCID mouse were engrafted subcutaneously with 10×10^6 cells of each, newly (C0401, J1209, N2803) or formerly (PRI) created human EBV latency III B cell lines. After fifteen days, generated tumors were recovered, dissociated and the expression of CD274/PD-L1 was studied by flow cytometry. Tumor cells strongly expressed PD-L1.

Supplementary figure 3:



Supplementary Figure 3. EBV latency I and latency III B-cells overexpress PD-L1 in a LMP1 dependent manner. Transcriptional expression of *IL-10*, *TGF-β*, *EB13* and *IL12A* was studied in the EREB2-5 B cell line (latency I), inducible for the latency III program by addition of β -estradiol (1 μ M). Cells were stably transfected to express luciferase (Luc), LMP1 wild type (LMP1-WT) or LMP1-CT (dominant negative of LMP1). Compared to the Luc condition, only *EB13* is under the dependence of LMP1 in this cellular model. Each experiment was performed at least three times.

Supplementary table 1: Antibodies used for flow cytometry

Specificity	Fluorochrome	Clone	Supplier	Dilution
Primary antibody				
CD3	V500	SK7	BD Biosciences	1/2.5
CD4	FITC	RPA-T4	BD Biosciences	1/2.5
CD8	APC-H7	SK1	BD Biosciences	1/10
CD25	BV421	2A3	BD Biosciences	1/10
CD25	PE	B1.49.9	Beckman Coulter	1/10
CD274/PD-L1	PE	29E.2A3	Biolegend	1/10
CD279/PD-1	PE	EH12.2.H7	Biolegend	1/10
FOXP3	PE	259D/C7	BD Biosciences	1/2.5
CD39	APC	TU66	BD Biosciences	1/2.5
LAP	PE	TW4-6H10	Biolegend	1/10
CTLA4	PE	L3D10	Biolegend	1/10
Hélios	PE	22F6	Biolegend	1/10
GITR	PE	621	Biolegend	1/10
LAG3	PE	T47-530	BD Biosciences	1/10
BMRF1 (EBV EA-D-p52/50)	Unconjugated*	R3	Millipore	1/10
Isotypic control				
Mouse IgG1	APC	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	APC-H7	MOPC-21	BD Biosciences	1/10
Mouse IgG1	BV421	X40	BD Biosciences	1/10
Mouse IgG1	FITC	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	PE	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	V500	X40	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG2b	PE	MPC-11	Biolegend	1/10

* Revealed by Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (H+L), Sigma-Aldrich, 1/10.
 CD: Cluster of Differentiation, APC: Allophycocyanin, BV: Blue Violet, FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: Phycoerythrin, V: Violet

III.3. Etude de thérapies visant l'axe PD-1/PD-L1 sur un modèle de suractivation de NF- κ B via LMP1/CD40

III.3.1. Synthèse de l'article

La protéine PD-L1 est dérégulée dans de multiples cancers liés à l'EBV mais aussi dans d'autres tumeurs solides comme le cancer du sein, des poumons ou le cancer colorectal (H. Yu et al. 2016; Schütz et al. 2017; Stein et al. 2018). Dans des cas de lymphomes B indépendant ou non de l'EBV, PD-L1 est aussi fréquemment surexprimée via le facteur de transcription NF- κ B (Xu-Monette, Zhou, et Young 2018).

En parallèle à l'article précédent nous avons donc voulu tester des traitements visant l'axe PD-1/PD-L1 dans un cas d'un modèle murin transgénique LMP1/CD40 suractivant les voies NF- κ B et développant un lymphome de type LZM (Hömig-Hölzel et al. 2008). Les cellules B du modèle présentant une surexpression de PD-L1, le traitement *in vivo* avec des Ac anti-PD-L1 s'est avéré efficace et a permis une réduction de la taille de la rate. Cela est dû à une diminution de la prolifération des cellules B, sans impact sur le nombre de cellules T et de granulocytes.

Dans ce modèle, en plus de la dérégulation du gène *Pd-1* via la suractivation des voies de NF- κ B, nous avons pu observer la surexpression d'autres gènes de la signature de l'échappement immunitaire (Laurent et al. 2015) comme *Pd-12*, *Il-10*, *Cd80* (B7.1) et *Mcl1*. La signalisation autocrine via l'IL10R et la surproduction d'IL10 entraîne l'activation des voies JAK/STAT3 permettant aussi la surexpression de *Pd-1*. De plus, cette synergie peut être encore amplifiée comme dans certains cas de DLBCL via l'engagement du BCR et de CD19 (L. Li et al. 2018). Nous avons donc confirmé que les 3 molécules ciblant ces voies (la PHA-408 ciblant directement NF- κ B, l'ibrutinib ciblant la BTK et le ruxolitinib ciblant JAK1/2) permettent une diminution de l'expression de PD-L1 après traitement *ex vivo* de splénocytes des souris LMP1/CD40. Ces molécules peuvent donc possiblement être associées aux thérapies anti-PD-L1 qui pourrait fonctionner dans les lymphomes B surexprimant *Pd-1*.

Ce travail est à rapprocher de deux autres publications du laboratoire pour lesquelles l'environnement immun des LZM spléniques humains est décrit d'une part et, d'autre part, montrant que l'immunosuppression induit la transformation du LZM dans le modèle LMP1/CD40. L'ensemble de ces travaux a conduit à proposer un modèle d'émergence clonale du lymphome B indolent tel que la cellule B soit l'objet d'une immunosurveillance imparfaite néanmoins réelle à la phase indolente de la maladie (Figure 42).

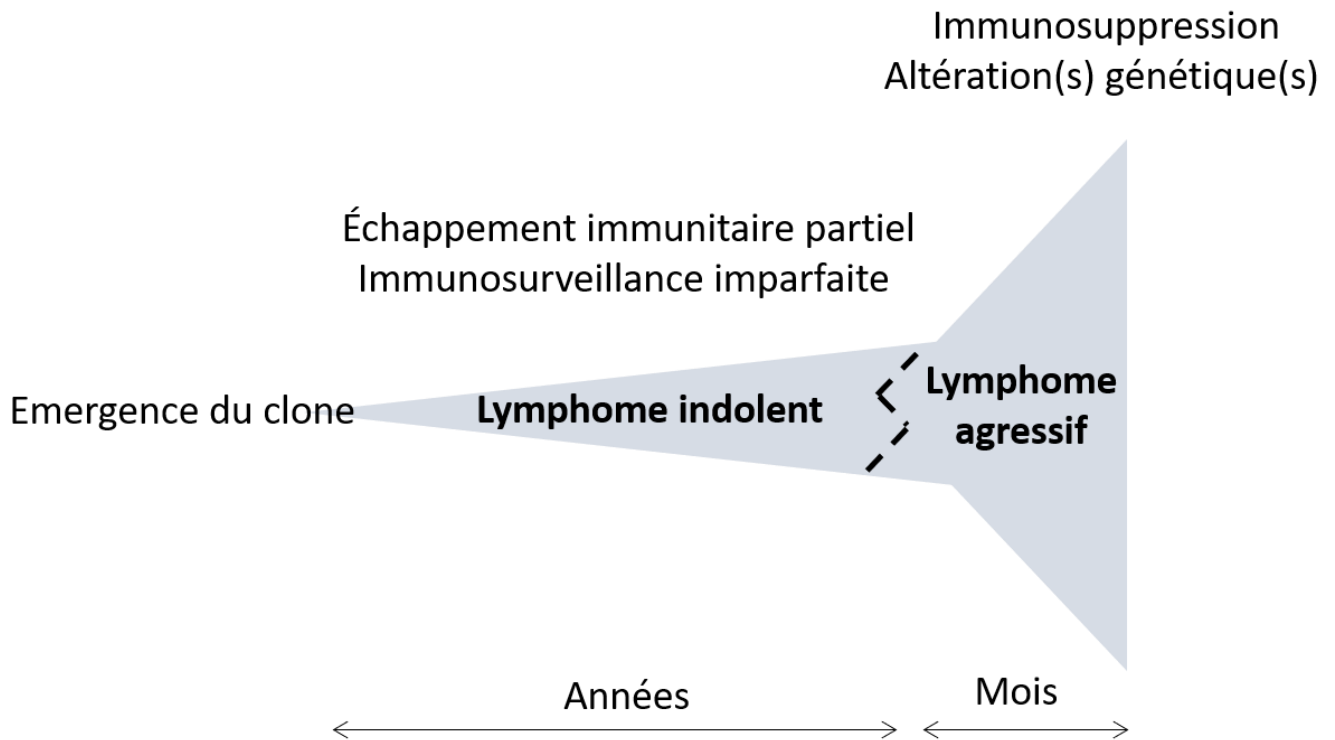


Figure 42 Modèle de l'émergence clonale du lymphome B indolent.
 (Figure adaptée de (C.Vincent-Fabert, Barcelona, International Splenic Lymphoma Study Group meeting 17th-18th May 2019))

RESEARCH

Open Access

Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF- κ B, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma

Christelle Vincent-Fabert¹, Lilian Roland¹, Ursula Zimmer-Strobl², Jean Feuillard¹ and Nathalie Faumont^{1*} **Abstract**

Escape from immune control must be important in the natural course of B-cell lymphomas, especially for those with activation of NF- κ B. The pre-clinical LMP1/CD40-expressing transgenic mouse model is characterized by B-cell specific CD40 signaling responsible for NF- κ B continuous activation with a spleen monoclonal B-cell tumor after 1 year in 60% of cases. LMP1/CD40 tumors B-cells expressed high levels of PD-L1. This expression was dependent on activation of either NF- κ B, JAK1/JAK2 or BTK pathways since these pathways were activated in tumor B-cells and ex vivo treatment with the inhibitory molecules PHA-408, ruxolitinib and ibrutinib led to decrease of its expression. Treatment of LMP1/CD40-expressing lymphomatous mice with an anti-PD-L1 monoclonal antibody induced tumor regression with decreased spleen content, activation and proliferation rate of B-cells as well as a marked increase in T-cell activation, as assessed by CD62L and CD44 expression. These results highlight the interest of therapies targeting the PD-1/PD-L1 axis in activated lymphomas with PD-L1 expression, with possible synergies with tyrosine kinase inhibitors.

Keywords: B-cell lymphomas, PD-L1, Immune surveillance

Background

Aberrant expression of the programmed death-ligand 1 (PD-L1, also known as B7-H1 or CD274) checkpoint molecule has been reported in many cancers such as breast, lung and colon tumors as well as during chronic viral infections like those with Epstein-Barr virus (EBV) for example [1, 2]. Efficacy of immunotherapies against the PD-1/PD-L1 axis in lung tumors or melanoma demonstrated the importance of the immune checkpoints in the control of emergence and growth of tumors [2]. As reviewed recently, various publications have indicated that disruption of immune checkpoints is also a critical step in B-cell non-Hodgkin's Lymphomas (NHL) [3]. NF- κ B, one of the most cited transcription factor in B-

cell lymphomas, is able to increase tumor cell expression of PD-L1 either directly or indirectly [3]. NF- κ B constitutive activation is found either in aggressive diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) with an activated phenotype (ABC-DLBCL), or in indolent B-cell lymphomas such as chronic lymphocytic leukemia, Waldenström Macroglobulinemia, marginal zone B-cell lymphomas (MZL) [4]. Here, we wanted to explore the putative interest of PD-L1 immune therapy against B-cell lymphoma with NF- κ B activation. To experimentally address this question, we used a transgenic mouse model which specifically express in B-cells a chimeric protein composed of the transmembrane moiety of the Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 (LMP1) and the transduction tail of CD40 (LMP1/CD40 protein), that results in continuous activation of NF- κ B, responsible for a spleen monoclonal B-cell tumor (LMP1/CD40 B-cell lymphoma) after 1 year in 60% of cases [5].

* Correspondence: nathalie.faumont@unilim.fr

¹UMR-CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL "Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations", CBRS "Centre de Biologie et de Recherche en Santé", Dupuytren Hospital University Center, University of Limoges, Hematology Laboratory of Dupuytren CHU, 2 rue du Pr Descottes, 87025 Limoges, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **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.

Methods

Mouse models and in vivo and ex vivo treatments

LMP1/CD40-expressing mice have been already described [5]. Animals were housed at 21–23 °C with a 12-h light/dark cycle. All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number: 87–022 and French ethics committee registration number “CREEAL”: 09-07-2012). For in vivo PD-L1 treatment, LMP1/CD40-expressing mice were injected intraperitoneally every 4 days for 3 weeks with 200 µg anti-PD-L1 antibody (clone 10F.9G2; Bio X cell; US). For ex vivo treatments, splenocytes were cultured for 48 h in complete RPMI medium (Eurobio) supplemented with 10% of FBS, 2 mM of L-Glutamine, 1% of Na pyruvate, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (ThermoFisher Scientific) and with the following treatments: either 10 µM of PHA-408 or 1.5 µM of ruxolitinib or 1 µM of ibrutinib.

Flow cytometry

Spleen from mice were collected and immune cells were filtered through a sterile nylon membrane. Cell suspensions were stained at 4 °C in FACS Buffer (PBS, 1% FBS, 2 mM EDTA) with the following fluorescent-labelled antibodies: anti B220-BV421 (clone RA3-6B2, 1/400), anti CD4-FITC (clone RM4–5, 1/2000), anti CD8a-APC (clone 53–6.7, 1/400), anti CD62L-BV421 (clone MEL-14, 1/200), anti CD44-PE (clone IM7, 1/200), anti-PD-L1-PE (clone 10F.9G2, 1/80), anti PD-1-PECy7 (clone 29F.1A12, 1/50), anti CD80-APC (clone 16-10A1, 1/2500) and anti CD86-FITC (clone GL-1, 1/600). Stained cells were analyzed using a BD-Fortessa SORP flow cytometer (BD Bioscience; US). Results were analyzed using Kaluza Flow Cytometry software 1.2 (Beckman Coulter; France).

Proliferation

For in vivo proliferation, mice were injected intraperitoneally with 2 mg BrdU (Sigma-Aldrich, US), 18 h before isolating cells. Splenocytes were stained for B220 and phases of cell cycle were analyzed by measuring BrdU and Propidium Iodide (PI)-incorporation, using the FITC-BrdU Flow Kit (BD Pharmingen; US).

Real time quantitative reverse-transcription PCR

Total RNA was extracted from CD19_Cre or LMP1/CD40 splenocytes and complementary DNAs were reverse transcribed from 1 µg of total RNA samples using the High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). PCR products were amplified from each cDNA using the TaqMan® Universal PCR Master Mix and TaqMan® Gene Expression Assays: IL-10/Mm01288386_m1, PD-L1/Mm03048248_m1, GAPDH/

Mm99999915_g1. The GAPDH gene was used as a reference gene for the control of amplification. The calculated relative gene expression level was equal to 2^{-DDCT} , where DDCT is the delta delta cycle threshold. Gene expression fold changes were calculated as the ratio of the test condition to its control.

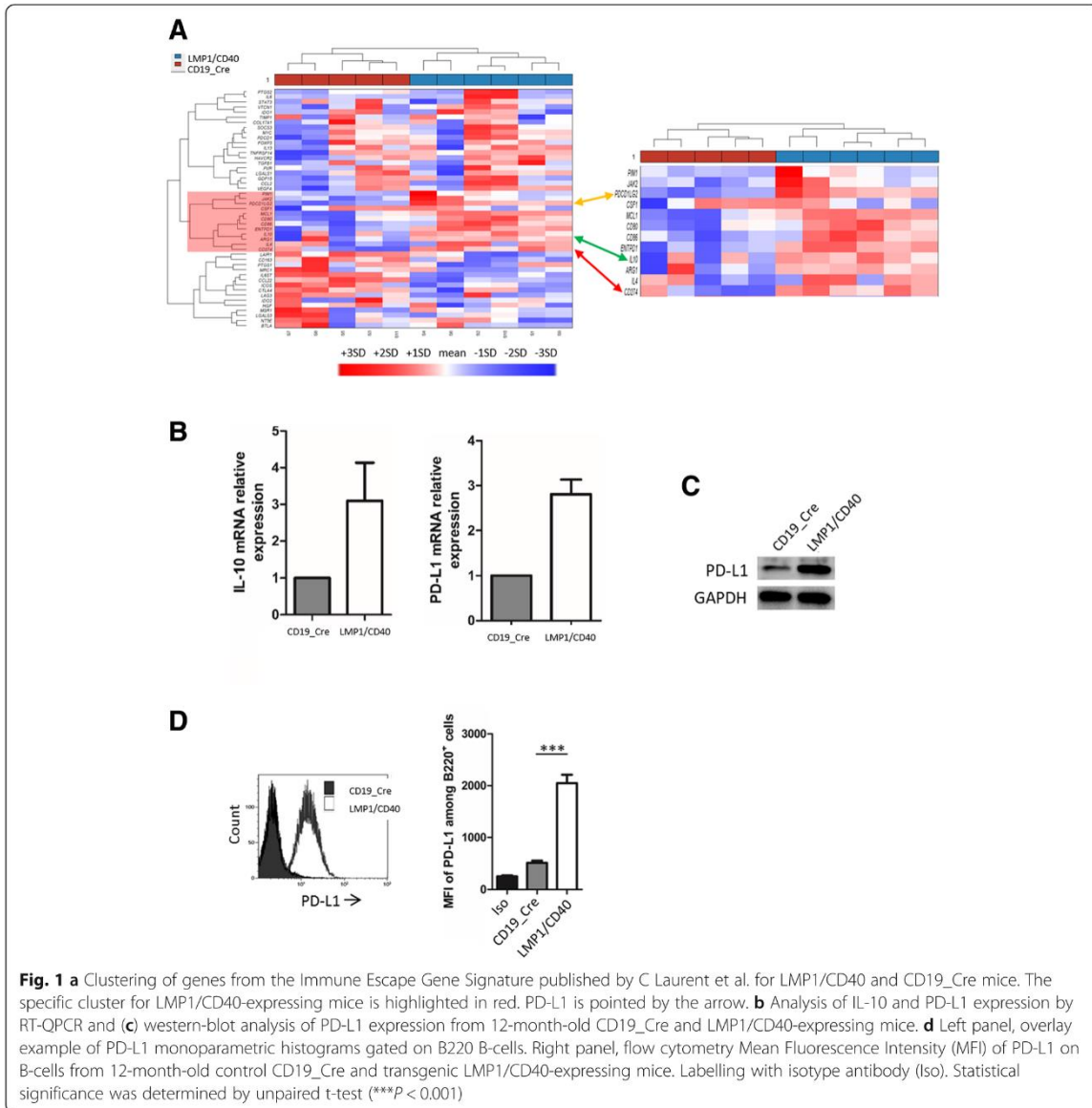
Immunoblot

10×10^6 cells were lysed and sonicated in Laemmli sample buffer. Lysates were separated on 12% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membrane. Revelation were done using anti-TRAF1 antibody (N-19) purchased from Santa Cruz Biotechnology; anti-STAT3 antibody (124H6) and anti-phosphoSTAT3 antibody (Tyr 705) (D3A7) from Cell Signaling Technology; and anti-ERK (p-44/42) antibody and anti-phosphoERK antibody (Thr 202/Tyr 204) from Cell Signaling Technology. Signals were visualized with Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). The amount of loaded protein was standardized against GAPDH using an anti-GAPDH antibody from R&D Systems. Membranes were numerized with ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad) and images were analysed with the Image Lab Software (Bio-Rad).

Results

Our previous transcriptome studies from LMP1/CD40-expressing mice suggested that those tumors might express high levels of CD274/PD-L1 [6]. We thus analyzed the Immune Escape Gene Signature published by C Laurent et al (Additional file 1: Table S1) [7] from the Affymetrix transcriptome (HT MG-430 PM Array, Additional file 1: Table S2 and Additional file 2: Table S3) of a series of six LMP1/CD40 B-cell lymphomas that were compared to their CD19_Cre littermate. As shown in Fig. 1a, both PD-L1 (red arrow) and PD-L2 (orange arrow) were co-clusterized with the immunosuppressive interleukin 10 (IL-10, green arrow), CD80 and MCL1, being over expressed. We confirmed overexpression of IL-10 and PD-L1 by RT-QPCR in 12-month-old LMP1/CD40-expressing mice when compared to CD19_Cre mice (Fig. 1b). We also showed higher levels of total PD-L1 expression by immunoblotting and of PD-L1 exported to the membrane by flow cytometry on LMP1/CD40 lymphoma cells from those mice than on B-cells from age related CD19_Cre mice (Fig. 1c and d).

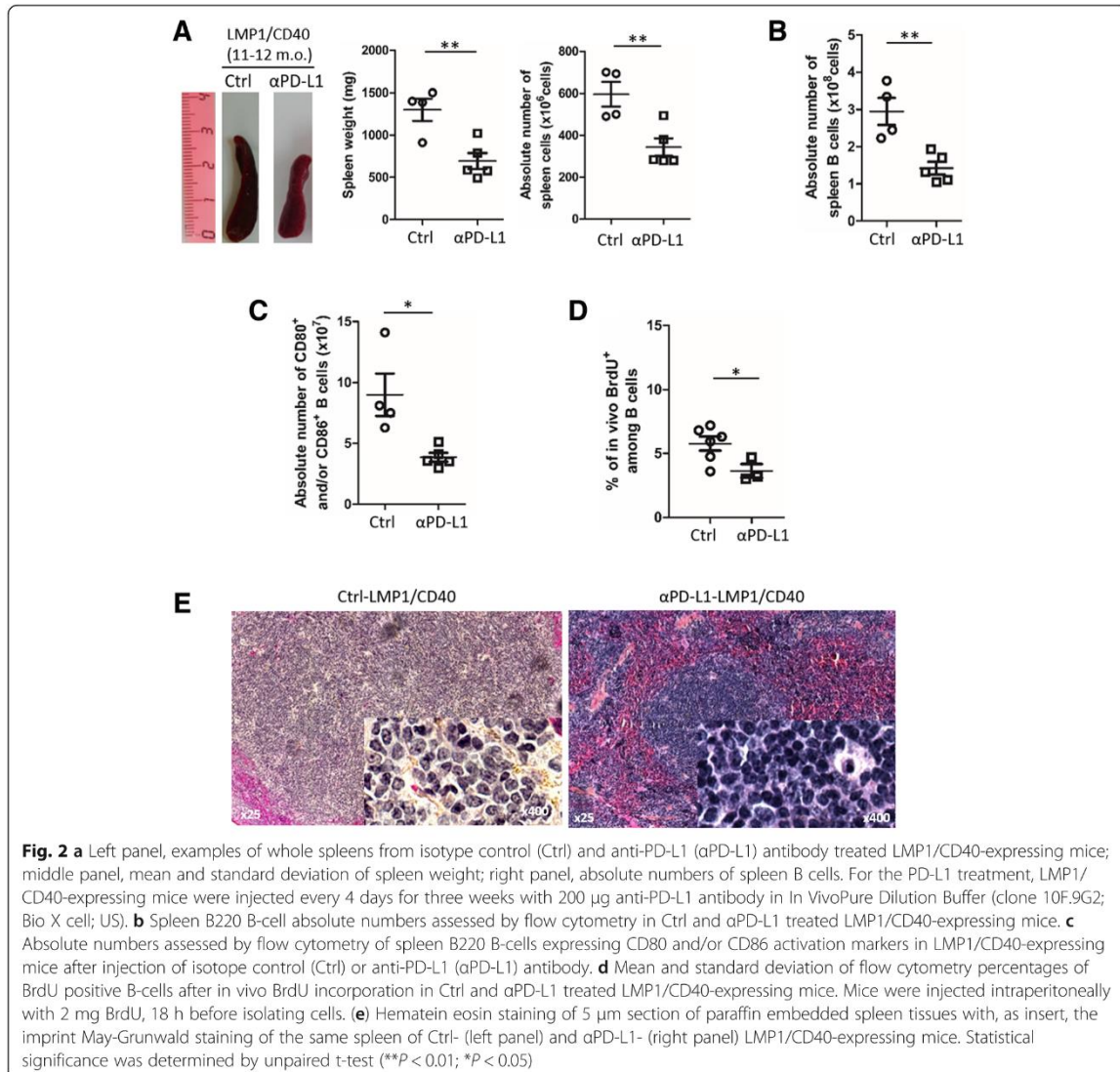
To address in vivo the role of PD-L1 in these B-cell lymphoma, LMP1/CD40-expressing mice were treated with an antibody blocking PD-1/PD-L1 signaling for 3 weeks according to a methodology already described [8, 9]. We observed a reduction of spleen size and absolute number of splenocytes in anti-PD-L1 treated LMP1/CD40-expressing mice (Fig. 2a), due to decreased B-cell numbers (Fig. 2b) without significantly affecting total



numbers of T-cells and granulocytes (Additional file 3: Figure S1). With PD-L1 blockade, we noticed a decrease in numbers of activated B-cells in LMP1/CD40-expressing mice (Fig. 2c). This was associated with a reduction in the in vivo proliferation rate of spleen B-cells, as assessed by the decrease of in vivo BrdU incorporation over 18 h (Fig. 2d). Morphologically, spleen lymphocytes from anti-PD-L1 treated LMP1/CD40-expressing mice were smaller with a more condensed chromatin (Fig. 2e). We then studied the impact of PD-1/PD-L1 blockade in T-cell compartment. Expression of T-cell activation markers CD62L and CD44 was increased on both

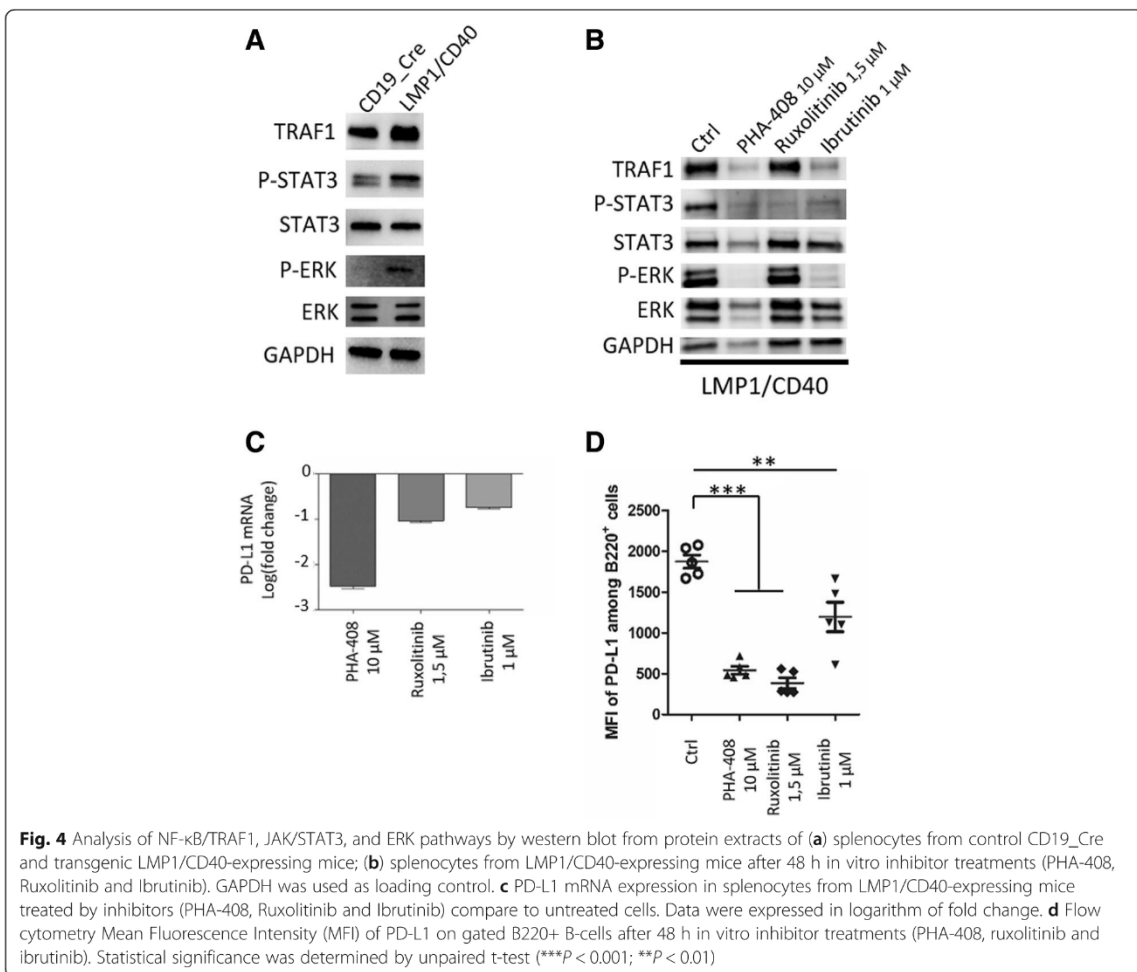
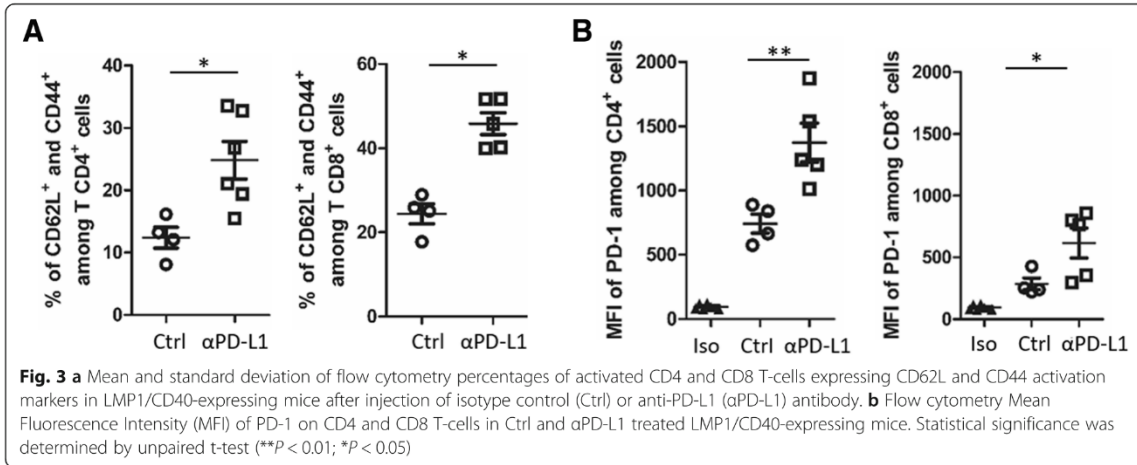
CD4 and CD8 T-cells (Fig. 3a). In parallel, an increase in PD-1 expression was observed on the surface of CD4 T-cells. This increase in PD-1 expression was more heterogeneous on CD8 T-cells (Fig. 3b).

In addition to be able to activate the classical pathway, CD40 is a strong inducer of the alternative NF- κ B activating pathway as already shown in LMP/CD40 mice [5]. CD40 constitutive activation of B-cells increases IL-10 expression [10]. IL-10 receptor signaling is mediated by the JAK1 and Tyk2 tyrosine kinase that leads to activation of STAT3 transcription factor, STAT3 being a major inducer of PD-L1 gene expression [11]. CD40



stimulation can also augment BCR-induced B cell responses by activation of Bruton's tyrosine kinase (BTK) either directly [12] or by interacting with CD19 [13]. The BCR is also able to induce the IL-10/STAT3 signaling with increased expression of PD-L1 in diffuse large B-cell lymphoma [11]. Comparing splenocytes of LMP1/CD40 mice to those of CD19_Cre mice, allowed to check activation of NF-κB, as assessed by increased expression of TRAF1. Increased phosphorylation of STAT3 and ERK indicated that IL-10 and BCR-related signaling pathways were also constitutively activated (Fig. 4a). LMP1/CD40 lymphoma B-cells were ex vivo treated with the PHA-408 molecule, an inhibitor of IKK2/NF-κB activation, the JAK1/JAK2 tyrosine kinase inhibitor

(TKI) ruxolitinib, and the BTK inhibitor ibrutinib. As expected, treatment with PHA-408 led to decreased expression of TRAF1 protein. This treatment also resulted in decreased phosphorylation of both STAT3 and ERK. Ruxolitinib treatment only decreased STAT3 activation. In presence of ibrutinib, TRAF1 expression and STAT3 phosphorylation were moderately decreased while ERK phosphorylation was completely abolished (Fig. 4b). As shown in Fig. 4c, PD-L1 mRNA expression was decreased in presence of the three inhibitors. This result was confirmed at the protein level. At the membrane level, PD-L1 expression was strongly reduced 48 h after treatment with either PHA-408 or Ruxolitinib and moderately with ibrutinib (Fig. 4d). These inhibitors also



decreased IL-10 expression (Additional file 3: Figure S2). Of note, modulation of PD-L1 expression was no longer observed on wild type CD19_Cre splenocytes treated with inhibitors (Additional file 3: Figure S3). Furthermore, CD40 plus IL-4, BCR, and IL-10R stimulation of CD19_Cre splenocytes induced over-expression of PD-L1, that induction being repressed when cells were treated with these inhibitors (Additional file 3: Figure S4).

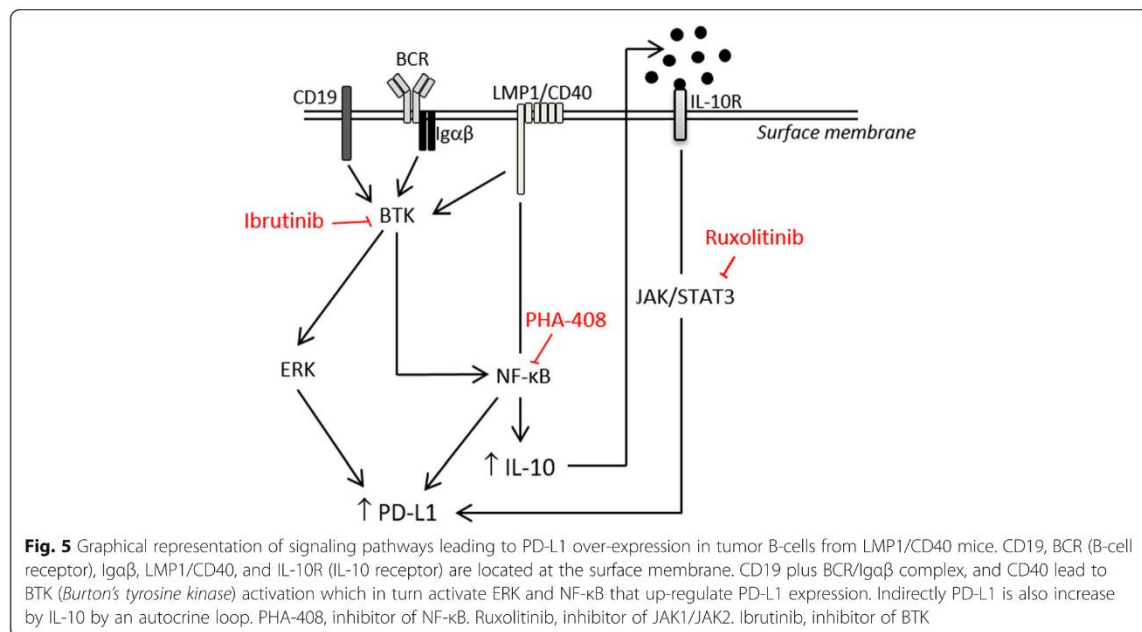
Altogether, these results show that CD40, IL-10 and BCR signaling pathways have complex interplays. As summarized in Fig. 5, the CD40 signaling pathway would be directly responsible for NF-κB activation and would increase the BCR signaling. Both BCR and CD40 signaling would lead to IL-10 secretion that secondary activate the JAK/STAT pathway in an autocrine manner. With NF-κB, both ERK and STAT3 activation would up-regulate expression of PD-L1. Blocking either NF-κB, BCR or STAT3 activation would led to decreased PD-L1 expression. PD-L1 expression was thus under the control of CD40 activation, either directly through NF-κB activation or indirectly through IL-10 induction of BCR sensitization and BTK activation.

Discussion

Expression of PD-1 and PD-L1 in B-cell lymphomas and effect of immune therapies against the immune checkpoint axe has been recently reviewed [3]. Expression of PD-L1 by tumor cells and effect of anti-PD-1 immune therapy has been clearly demonstrated in Hodgkin’s

lymphoma, a tumor which is constantly associated with both NF-κB and STAT3 activation. In DLBCL, expression of PD-L1 is variable but participates to the gene immune escape signature of ABC-DLBCLs [3, 7]. ABC-DLBCL are not only associated with NF-κB activation but may exhibit a chronic active BCR [14] and are sensitive to BTK inhibitors [15]. STAT3 activation mainly found in ABC-DLBCLs and is associated with poor survival [16].

Here, our results show that NF-κB activated B-cell lymphoma of the LMP1/CD40-expressing mouse model exhibited an immune escape gene signature involving expression of PD-L1 and PD-L2, which expression was co-clusterized with IL-10. Over-expression of PD-L1 not only involved NF-κB activation by CD40 but also BTK and JAK/STAT signaling, the latter probably being indirectly regulated via an autocrine loop with participation of IL-10 for example. Indeed, PD-L1 expression could be down-regulated after treated with NF-κB, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors. Expression of PD-L1 was very likely to be associated to tumor immune escape as demonstrated for numerous solid cancers such as melanoma of lung cancers [2]. Indeed, in vivo blockade of PD-L1 was able to rapidly repress expansion of these B-cell lymphomas, with concomitant decrease in both B-cell proliferation and B-cell expression of activation markers as well as an increase in T-cell activation. Among these markers are expression of PD-1 on both CD4 and CD8 T-cells. PD-1 is transcriptionally induced in activated T cells [17]. PD-1 expression on activated T-cells allowed



subsequent exhaustion and inhibition thank to PD-1/PD-L1 interaction to return to unactivated state [18]. Our results indicate that such T-cell inhibition no longer occurred when PD-L1 was blocked.

Conclusion

Our results indicate that therapies against the PD-L1/PD-1 axis may work in lymphomas as long as the tumor cells express PD-L1. Our results also suggest that combination of immune therapy targeting the PD-1/PD-L1 axis and TKI specific for the JAK/STAT or the BCR/BTK pathway could be of interest. Even if these chemical inhibitors such as ruxolitinib or ibrutinib could have their own inhibitory effect on actors of the anti-tumor response such as cytotoxic T-cells or macrophages, our results also raise the question of the effect of these molecules on the local reactivation of the immune system.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Immune Escape Gene signature adapted to the Affymetrix HG-U133_Plus_2 array. **Table S2.** Immune Escape Gene signature adapted to the HT MG-430 PM Array. (DOCX 32 kb)

Additional file 2: Table S3. Normalized expression levels of genes belonging to the immune escape gene signature of splenocytes from LMP1/CD40 and CD19_Cre mice. (DOCX 25 kb)

Additional file 3: Figure S1. Absolute number of spleen granulocytes (A) and T-cells (B) in LMP1/CD40-expressing mice after injection of isotype control (Ctrl) or anti-PD-L1 (αPD-L1) antibody. For the PD-L1 treatment, LMP1/CD40-expressing mice were injected every 4 days for three weeks with 200 μg anti-PD-L1 antibody in On VivoPure Dilution Buffer (clone 10F.9G2; Bio X cell; US). ns, non-significant. **Figure S2.** IL-10 mRNA expression in splenocytes from LMP1/CD40-expressing mice treated with the PHA-408, ruxolitinib and ibrutinib inhibitors. Results are expressed in logarithm of fold change by comparison with the control. **Figure S3.** Analysis of NF-κB/TRAF1, JAK/STAT3, and ERK pathways by western blot of protein extracts from splenocytes of control CD19_Cre mice after 48 h in vitro treatment with the PHA-408, ruxolitinib and ibrutinib inhibitors. GAPDH was used as loading control. **Figure S4.** Analysis of PD-L1 expression by western blot of protein extracts from splenocytes of CD19_Cre mice i) after 48 h in vitro CD40 (R&D Systems), CD40 plus IL-4 (Peprotech), IL-10 (R&D Systems), IgM (Jackson ImmunoResearch) stimulations (lane 2 to 5), and ii) after 24 h in vitro CD40, CD40 plus IL-4, IL-10, IgM stimulations followed by 24 h treatment with the PHA-408, ruxolitinib and ibrutinib inhibitors (lanes 6 to 9). GAPDH was used as loading control. (PPTX 6393 kb)

Abbreviations

ABC-DLBCL: Diffuse large B-cell lymphomas with an activated phenotype; BCR: B-cell receptor; BTK Inhibitor (ibrutinib): Bruton's tyrosine kinase inhibitor; CD19_Cre mice: Mice expressing Cre-recombinase under the control of the B-specific CD19 promoter; EBV: Epstein-Barr virus; LMP1/CD40 protein: Fusion protein containing the amino-terminal part and the transmembrane part of the Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 and the transduction tail of CD40; LMP1/CD40-expressing mice: Mice expressing LMP1/CD40 fusion protein only in B-cell thanks to a stop cassette deletion by Cre-recombinase at the CD19 locus; NF-κB: Nuclear factor kappa B; PD-1: Also known as CD279, Programmed cell death 1; PD-L1: Also known as B7-H1 or CD274, programmed death-ligand 1; PHA-408: An inhibitor of I kappa-B kinase 2; TKI (ruxolitinib): Janus kinase 1/2 tyrosine kinase inhibitor

Acknowledgements

We thank Dr. J Cook Moreau, UMR CNRS 7276, Limoges, France, for English editing.

Authors' contributions

C.V.F. performed, analyzed experiments and contributed to the writing. L.R. helped to perform proliferation and flow cytometry experiments. U.Z.S. helped analyze the results and contributed to the writing of the manuscript. J.F. and N.F. designed and directed the study, contributed to the experiments, analyzed the results and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The group of J Feuillard is supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue), the Institut National du Cancer (INCa), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the Limousin Region and the Haute Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer and by the Lyons Club of Corrèze. U Zimmer-Strobl was supported by the German Research Foundation (SFB 1243, TP-A13).

Availability of data and materials

The data sets supporting the results of this article are included within the article and its additional files.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹UMR-CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL "Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations", CBRS "Centre de Biologie et de Recherche en Santé", Dupuytren Hospital University Center, University of Limoges, Hematology Laboratory of Dupuytren CHU, 2 rue du Pr Descottes, 87025 Limoges, France. ²Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Munich, Germany.

Received: 22 January 2019 Accepted: 15 July 2019

Published online: 05 August 2019

References

- Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouy-Marfat I, Rouaud P, Ouk-Martin C, David A, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;189(1):181–190.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450–61.
- Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*. 2018;131(1):68–83.
- Yu L, Li L, Medeiros LJ, Young KH. NF-κB signaling pathway and its potential as a target for therapy in lymphoid neoplasms. *Blood Rev*. 2017;31(2):77–92.
- Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Müller W, et al. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2008; 205(6):1317–29.
- David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, et al. C-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor-κB activated B cells. *Haematologica*. 2017;102(5):883–94.
- Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert L, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology*. 2015;4(8):e1026530.
- Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009; 114(8):1545–52.

9. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, et al. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest*. 2014;124(2):687–95.
10. Koni PA, Bolduc A, Takezaki M, Ametani Y, Huang L, Lee JR, et al. Constitutively CD40-activated B cells regulate CD8 T cell inflammatory response by IL-10 induction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 avr 2013;190(7):3189–96.
11. Li L, Zhang J, Chen J, Xu-Monette ZY, Miao Y, Xiao M, et al. B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 25 oct 2018;132(17):1805–17.
12. Brunner C, Avots A, Kreth HW, Serfling E, Schuster V. Bruton's tyrosine kinase is activated upon CD40 stimulation in human B lymphocytes. *Immunobiology*. oct 2002;206(4):432–40.
13. Hojer C, Frankenberger S, Strobl LJ, Feicht S, Djermanovic K, Jagdhuber F, et al. B-cell expansion and lymphomagenesis induced by chronic CD40 signaling is strictly dependent on CD19. *Cancer Res*. 15 août 2014;74(16):4318–28.
14. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 7 janv 2010;463(7277):88–92.
15. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. août 2015;21(8):922–6.
16. Huang X, Meng B, Iqbal J, Ding BB, Perry AM, Cao W, et al. Activation of the STAT3 signaling pathway is associated with poor survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 déc 2013;31(36):4520–8.
17. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. mai 1996;8(5):765–72.
18. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027–34.

Publisher's Note

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

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



IV- Discussion et perspectives

Les difficultés de la mise en place d'un modèle transgénique développant une pathologie similaire à un lymphome humain sont telles que très peu de tests précliniques sont réalisés sur ces modèles. La très grande majorité des tests est donc effectuée sur des tumeurs transplantées via isogreffe ou xéno greffe respectivement dans des souris immunocompétentes ou dépourvues de système immunitaire. Cependant, le développement de thérapies ciblant les interactions avec le microenvironnement nécessite des modèles transgéniques possédant un système immunitaire évoluant avec la tumeur. En effet ces derniers sont plus représentatifs de la complexité de la modulation du microenvironnement par les cellules tumorales et de l'émergence des lymphomes chez l'humain.

La protéine aberrante MYD88 dans les modèles de Knittel ou de Sewastianik ne permet pas l'émergence d'un clone lymphoplasmocytaire proliférant modérément (Knittel et al. 2016; Sewastianik et al. 2019). Le modèle d'expression endogène de MYD88^{L252P} de Knittel, développe dans certain cas un lymphome clonal mais avec un phénotype caractéristique des ABC-DLBCL (Knittel et al. 2016). MYD88^{L265P} est beaucoup plus fréquent dans la MW (90%) que dans les ABC-DLBCL (30%). Alors pourquoi l'émergence clonale MYD88 dépendante est associée à un phénotype agressif ? Ceci, pourrait être dû à la divergence entre l'organisme murin et humain, et soulève la question du fond génétique murin le plus adapté à l'étude de la MW. En effet, le modèle de Knittel a été réalisé avec la souche de souris C57bl/6 qui prédispose les souris à la gammopathie monoclonale bénigne avec des niveaux plus élevés d'IgG (van den Akker et al. 1988). Le croisement des souris MYD88^{L252P} avec la souche Balb/c peut favoriser les IgM MGUS et WM car des niveaux plus élevés d'IgM que d'IgG ont été observé chez les souris Balb/c âgées (Kalpaktsoglou, Hong, et Good 1973). Dans le modèle de Tompkins réalisé avec la souche murine Balb/c, la surexpression conditionnelle aux cellules B (E μ) de *BCL2* et *IL6*, entraîne une lymphoprolifération des cellules B IgM+ cependant l'impact du fond génétique sur la clonalité à IgM est fortement biaisé par l'invalidation ubiquitaire de AID dans ce modèle (Tompkins et al. 2016; X. Yu et al. 2018). Notre modèle est issu d'un croisement entre les fonds génétiques C57bl/6 (MYD88^{L252P}) et Balb/c (Cd19-CRE), et permet l'émergence d'un lymphome lymphoplasmocytaire à clonalité IgM de phénotype indolent. Seulement chez les souris plus âgée, le lymphome se transforme en lymphome agressif à grande cellules avec un fort pouvoir proliférant (ABC-DLBCL). Le « crossing over » issu de la méiose de la génération F1 hétérozygote (C57bl/6 x Balb/c) peut donc être une des raisons pour laquelle le lymphome se transforme chez certaines souris. Le séquençage des ARN totaux, et l'analyse par alignement des séquences avec le génome de référence C57bl/6

d'une part, et Balb/c d'autre part, permettrait de retrouver les mutations germinales acquises sur les gènes exprimés (les mutations présentes seulement lors de l'alignement avec une référence sont donc issues du génome de l'autre souche murine). De plus, cette transformation pourrait être aussi due à l'acquisition de mutations au cours de leur développement. Le séquençage du génome (ou des ARN totaux) nous permettrait alors d'analyser les mutations somatiques (ces mutations sont celles retrouvées lors de l'alignement avec les deux génomes de références). De fait, la caractérisation des événements génétiques et/ou environnementaux entre la forme indolente et agressive au sein d'une même souris dans notre modèle, pourrait permettre de découvrir de nouveaux phénomènes à l'origine de la transformation d'un lymphome. La transformation en lymphome agressif pourra aussi nous permettre d'étudier la différenciation plasmocytaire retrouvée dans les cas de ABC-DLBCL possédant la mutation MYD88^{L265P}.

La contrepartie non tumorale des cellules de la MW se situe entre le lymphocyte B mature post-CG et le plasmocyte ou le B mémoire (Parrens et al. 2008; Morice et al. 2009). Dans le cas de notre modèle nous avons observé cette clonalité lymphoplasmocytaire à sécrétion d'IgM cependant nous ne pouvons pas certifier que le clone soit issu du CG. Mais les régions VDJ (CDR3) sont peu mutées (résultats non montrés). Il se pourrait que l'expression précoce de la mutation MYD88^{L252P} ne permette pas la SHM ou que l'hypermutation somatique soit difficilement reproductible chez la souris mettant en valeur une limite du modèle murin. Nous développons donc un modèle d'expression plus tardive *chaîne-J-cre_Myd88^{L252P}* (décrit ci-après).

Par rapport à la MW chez l'humain où la tumeur est localisée dans la moelle osseuse, la tumeur de nos souris Cd19-Cre_Myd88^{L252P} est localisée majoritairement dans la rate. Or, 20% des cas de MW ont une splénomégalie clinique. De plus, ce modèle présente une augmentation des plasmocytes à IgM avec la présence d'un continuum de différenciation lymphoplasmocytaire. Ces similitudes suggèrent que l'évènement primaire MYD88^{L265P} chez l'homme pourrait se produire dans la rate et qu'un ou plusieurs évènements secondaires seraient à l'origine de la localisation des cellules tumorales dans la moelle osseuse. Dans notre modèle murin, l'expression précoce de MYD88^{L252P} dans le développement B, pourrait être à l'origine de la transformation et de la prolifération d'une cellule B mature naïve pré-CG semblables aux B blastiques se différenciant directement en dehors du follicule (ni SHM, ni CSR) en plasmocytes à IgM de courte durée de vie. Ces derniers, ne migrant donc peu dans la moelle osseuse. Pour répondre à la question de l'influence du CG sur la localisation des

cellules tumorales de la MW des plasmocytes à IgM, nous développons un modèle murin exprimant la mutation MYD88^{L252P} plus tardivement dans le développement B, dont le gène *Myd88* muté est toujours floxé dans le locus *Rosa* mais la CRE-recombinase est sous le contrôle du promoteur du locus de la *chaîne J*, permettant une expression de la protéine mutée spécifique par les plasmocytes. Ainsi, la cellule B pourra suivre un développement normal jusqu'à la différenciation post-CG pouvant hypothétiquement former des plasmocytes à IgM de longue durée de vie, migrant habituellement dans la moelle osseuse. Cependant, chez l'humain les plasmocytes à IgM présents dans la moelle osseuse ne sont pas clairement identifiés comme des plasmocytes à IgM de longue durée de vie. Ces plasmocytes pouvant être de courte durée de vie, ils auraient alors subi un évènement secondaire leur permettant de migrer de façon non habituelle dans la moelle osseuse. C'est pourquoi, le gène *Cxcr4* muté dans 30 à 40% des cas de MW (Hunter et al. 2014) et responsable de la migration cellulaire, semble être un bon candidat pour une seconde mutation : CXCR4^{S338X} (Balabanian et al. 2012; Poulain et al. 2016) dans le modèle Cd19-Cre_Myd88L252P. En ce sens nous développons aussi un modèle MYD88/CXCR4 double muté.

Lorsque des cas de MW ne possédant pas de mutations sur le gène *CXCR4* dans 60 à 70% des cas, la migration serait donc due à un ou plusieurs autres évènements secondaires. Des évènements fréquents de la MW comme les délétions du chromosome 6q, 11q, 13q, 17p ou aux trisomies des chromosomes 4 ou 18 (Nguyen-Khac et al. 2013) pourraient en être à l'origine. Il est intéressant de constater que les délétions sur le chromosome 6q et les mutations du gène *CXCR4* semblent être mutuellement exclusives (Guerrera et al. 2018). En effet, une récente étude basée sur le méthylome, a démontré que les mutations de *CXCR4* sont corrélées avec les cas de MW à cellules B mémoires alors que les del6q corrélerent avec les cas de WM à cellules différenciées en plasmocytes (Roos-Weil et al. 2020). Les gènes fréquemment délétés du chromosome 6 dans les cas de WM sont *PLEKHG1* (70%), *HIVEP2* (77%), *BCLAF1* (70%), *ARID1B* (70%) et *TNFAIP3* (50%) (Hunter et al. 2014; Guerrera et al. 2018). De plus d'autres gènes semblent être délétés plus fréquemment lorsque *CXCR4* n'est pas muté : *PRDM2* (93%), *BTG1* (87%) *MKLN1* (77%), *LYN* (60%) et *FOXP1* (37%) (Hunter et al. 2014). Il serait donc aussi intéressant de réaliser les délétions de ces gènes de manière conditionnelle aux cellules B dans notre modèle murin Cd19-Cre_Myd88^{L252P}. Ceci en privilégiant les gènes de la signature de la migration ou de la voie NF-κB.

Parmi toutes ces protéines, TNFAIP3, HIVEP2 et LYN sont des inhibiteurs de la voie NF-κB. Ces délétions fréquentes semblent donc entrer en synergie avec MYD88^{L252P}. Les

protéines LYN et TNFAIP3 respectivement impliquées dans la régulation de la voie du BCR et de NF- κ B induisent une différenciation plasmocytaire dans le modèle *Lyn*^{-/-} (Nishizumi et al. 1995; Chan et al. 1997) et la prolifération des plasmocytes dans le modèle *Cd19-Cre-a20*^{-/-} (Tavares et al. 2010; Chu et al. 2011; Hövelmeyer et al. 2011). Ces délétions pourraient être des événements secondaires très intéressants pour l'étude de la lymphomagénèse de la MW dans notre modèle murin porteur de la mutation *MYD88*^{L252P}. Cependant, aux vues de l'auto-immunité due à la dérégulation du BCR dans le développement B précoce de ces modèles, il serait judicieux d'utiliser le système *Cd21-Cre (B-T2) Aid-Cre (B-CG)* pour déléter *Lyn* ou *Tnfaip3* à partir des stades périphériques des cellules B afin que la dégradation des B auto-immuns précoces soit réalisée.

Lors de la caractérisation des aspects immunomodulateurs des cellules B humaines infectées par l'EBV, nous avons pu mettre en valeur la surexpression de PD-L1 dépendante de LMP1, permettant l'expansion des cellules T régulatrices autologues ainsi que la surexpression des cytokines IL10, IL35 et TGF- β 1. *In vitro* les cellules B infectées par l'EBV sont donc phénotypiquement proches des lymphocytes B régulateurs. Chez l'humain, bien que l'impact des lymphomes B sur le microenvironnement soit mieux connu de nos jours, les conséquences des lymphomes B liés à l'EBV sur le microenvironnement restent encore peu connues.

Dans les cas de LH classiques positifs à l'EBV, PD-L1 est aussi surexprimé via LMP1, la voie AP-1 et JAK/STAT (Green et al. 2012), justifiant leur sensibilité aux traitements anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, tislelizumab, camrelizumab and sintilimab) (N. Lin, Song, et Zhu 2020). Les traitements visant ces checkpoints immunitaires sont efficaces dans environ 70% des cas de LH, cependant la réponse à ces traitements dans les LNH sont plus faibles (Kuzume et al. 2020).

Les cas de DLBCL surexprimant PD-L1 sont associés à une plus faible survie des patients (Kiyasu et al. 2015). En plus de cette surexpression, lors des cas de DLBCL à EBV positif, il est fréquemment observé une sous-expression du BCR et du CMHII pouvant amplifier l'échappement immunitaire (Jiang et al. 2019). Cette capacité à passer sous le seuil de détection du système immunitaire entre en synergie avec l'inhibition de ce dernier. En effet, comme nous avons pu le démontrer *in vitro* avec l'expansion des Tregs via l'axe PD-1/PD-L1, les cellules T du microenvironnement sont affectées par les cellules tumorales et surexpriment les protéines CTLA4, Hélios, GITR et LAG3. Ces dernières, avec TIM3 et PD-1 sont souvent

retrouvées surexprimées par les cellules T du microenvironnement de divers tumeurs solides (mélanome, cancer du sein, du poumon, des ovaires) et sont associées à un mauvais pronostic lorsqu'elles sont surexprimées dans les lymphomes B, notamment pour LAG3 dans les LF et DLBCL (Kuzume et al. 2020).

La surexpression des protéines permettant l'échappement immunitaire s'étend aussi aux lymphomes non liés à l'EBV. L'importance de trouver des traitements efficaces ciblant et inhibant ces protéines est donc cruciale pour améliorer les immunothérapies actuelles et éviter l'épuisement des cellules T. Pour exemple, la surexpression de ces protéines checkpoints entraîne la résistance des lymphome B aux traitements par « CAR-T cell ». Certains tests actuels consistent donc à coupler des traitements « CAR-T cell » vecteur de CD19 avec le gène *PD-1* inactivé ou encore à associer les thérapies actuelles avec des anticorps monoclonaux ciblant les protéines CTLA4, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM (Huemer et al. 2020).

Les thérapies combinées ciblant à la fois la tumeur et le microenvironnement tumoral semblent être une approche très intéressante dans le traitement de lymphomes. C'est pourquoi, nous nous sommes donc aussi intéressés à l'efficacité de la thérapie visant à inhiber l'axe PD-1/PD-L1 dans le traitement du lymphome de la zone marginale. Nous avons pu prouver l'efficacité d'une thérapie par Ac anti-PD-L1 (clone 10F.9G2) dans le cadre d'un modèle murin développant ce lymphome caractérisé par une surexpression de PD-L1. Nous avons confirmé *ex vivo* la réduction de l'expression protéique et transcriptomique de PD-L1 lors de traitements anti-NF- κ B (PHA-408), anti-JAK1/2 (Ruxolutinib) et anti-BTK (Ibrutinib). Par la suite nous pourrions tester de coupler ces traitements *in vivo* dans ce modèle et d'autres modèles murins développant un lymphome surexprimant PD-L1.

Une étude récente sur l'impact des gènes fréquemment mutés dans les LNHB, activant la voie NF- κ B (MYD88, CD79B, CARD11, I κ z) dans un contexte agressif (transduction des gènes mutés dans des cellules souche hématopoïétique E μ -MYC et greffe syngénique de ces CSH dans des souris immunocompétentes Balb/c) a démontré que les cellules tumorales possédant *CARD11* ou *MYD88* mutés exprimaient fortement *PD-L1* (Reimann et al. 2020).

Bien que l'expression de PD-L1 soit faible à la surface des cellules tumorales des patients atteints de la MW, la forme soluble de PD-L1 est retrouvée en plus grande quantité dans le sérum (Jalali et al. 2018). Il sera donc intéressant par la suite de visualiser si les cellules

lymphoplasmocytaires de notre modèle surexpriment PD-L1 et/ou PD-L2 ainsi que leur forme soluble et de caractériser les conséquences sur le microenvironnement ainsi que de tester des thérapies en phase préclinique visant l'axe PD1/PD-L1.

V- Conclusion générale

Au cours de ces 3 années de thèse j'ai eu l'occasion de travailler sur 3 types de LNHB différents : La MW et le LZM au travers de 2 modèles murins, et le lymphome lié à l'EBV au travers de modèles cellulaires humain *in vitro*.

Nous avons pu valider une grande similarité de notre modèle murin avec la MW même si des différences existent. Il pourra être sujet à une amélioration par association d'évènements secondaires visant à relocaliser la tumeur dans la moelle osseuse. Par exemple, en développant un modèle double muté MYD88/CXCR4. Ce modèle pourra aussi être amélioré en retardant la transformation qui est un évènement relativement rare chez l'humain. Par exemple en renforçant la surveillance immunitaire antitumorale. A l'heure actuelle, ce modèle est le plus proche de la MW, et permet de comprendre le rôle que joue MYD88, activateur de la voie canonique de NF- κ B, dans l'émergence du clone et du continuum de différenciation plasmocytaire dans ce lymphome ainsi que dans l'apparition du pic d'IgM. De plus, il peut faire l'objet de tests précliniques ciblant les aspects précédemment cités retrouvé dans la MW mais aussi dans certains cas de DLBCL.

L'étude de l'EBV par les modèles cellulaires B, se rapprochant phénotypiquement du lymphocyte Breg, nous a permis de comprendre comment la cellule B influence le microenvironnement tumoral. Nous avons mis en valeur l'importance de LMP1, activateur de la voie canonique de NF- κ B, dans la surexpression de PD-L1 et dans la répression des cellules T autologues. Ceci mettant en valeur une des causes majeures de l'émergence des lymphomes lié à EBV.

Le modèle de LZM murine de Hömig-Hölzel où l'émergence du lymphome est dû à la protéine chimérique L.CD40, activateur des voies canoniques et non canoniques de NF- κ B, et surexprimant PD-L1, nous a permis de valider l'efficacité des thérapies anti-PDL1 *in vivo* ou *ex vivo*. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives sur les tests précliniques ciblant l'échappement immunitaire des LNHB liés à la mutation activatrice MYD88.

Les travaux tant sur l'EBV, que sur le LZM murin, nous ont permis d'acquérir l'expertise pour l'étude de l'échappement à la surveillance antitumorale des LNHB, porteurs de la mutation activatrice de MYD88 et du rôle de NF- κ B en rapport.

Références

- Abdul-Sater, Ali A., Maria I. Edilova, Derek L. Clouthier, Achire Mbanwi, Elisabeth Kremmer, et Tania H. Watts. 2017. « The Signaling Adaptor TRAF1 Negatively Regulates Toll-like Receptor Signaling and This Underlies Its Role in Rheumatic Disease ». *Nature Immunology* 18 (1): 26-35. <https://doi.org/10.1038/ni.3618>.
- Agarwal, Anju, Kingshuk Das, Natalia Lerner, Swati Sathe, Muzaffer Cicek, Graham Casey, et Nywana Sizemore. 2005. « The AKT/I κ B Kinase Pathway Promotes Angiogenic/Metastatic Gene Expression in Colorectal Cancer by Activating Nuclear Factor-KB and β -Catenin ». *Oncogene* 24 (6): 1021-31. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208296>.
- Ahn, Jae-Hee, Jaewon Cho, Bo-Eun Kwon, Geun-Shik Lee, Sung-il Yoon, Seung Goo Kang, Pyeung-Hyeun Kim, et al. 2019. « I κ B ζ facilitates protective immunity against Salmonella infection via Th1 differentiation and IgG production ». *Scientific Reports* 9 (juin). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44019-3>.
- Akdis, Mübeccel, Alar Aab, Can Altunbulakli, Kursat Azkur, Rita A. Costa, Reto Cramerli, Su Duan, et al. 2016. « Interleukins (from IL-1 to IL-38), Interferons, Transforming Growth Factor β , and TNF- α : Receptors, Functions, and Roles in Diseases ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (4): 984-1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. 2006. « Pathogen Recognition and Innate Immunity ». *Cell* 124 (4): 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Akiyama, Taishin, Miho Shinzawa, et Nobuko Akiyama. 2012. « TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells ». *Frontiers in immunology* 3 (septembre): 278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00278>.
- Akker, T W van den, E de Glopper-van der Veer, J Radl, et R Benner. 1988. « The influence of genetic factors associated with the immunoglobulin heavy chain locus on the development of benign monoclonal gammopathy in ageing IgH-congenic mice. ». *Immunology* 65 (1): 31-35.
- Alizadeh, Ash A, Michael B Eisen, R Eric Davis, Chi Ma, Izidore S Lossos, Andreas Rosenwald, Jennifer C Boldrick, et al. 2000. « Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling ». *Cell* 109 (1): 15-24. [https://doi.org/10.1016/S0092-9646\(00\)00638-4](https://doi.org/10.1016/S0092-9646(00)00638-4).
- Allende, Maria L., Galina Tuymetova, Bridgin G. Lee, Eliana Bonifacino, Yun-Ping Wu, et Richard L. Proia. 2010. « S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (5): 1113-24. <https://doi.org/10.1084/jem.20092210>.
- Allman, David, R. Coleman Lindsley, William DeMuth, Kristina Rudd, Susan A. Shinton, et Richard R. Hardy. 2001. « Resolution of Three Nonproliferative Immature Splenic B Cell Subsets Reveals Multiple Selection Points During Peripheral B Cell Maturation ». *The Journal of Immunology* 167 (12): 6834-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6834>.
- Almqvist, N., et I.-L. Mårtensson. 2012. « The Pre-B Cell Receptor; Selecting for or against Autoreactivity ». *Scandinavian Journal of Immunology* 76 (3): 256-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02751.x>.
- Angerami, Matías T., Guadalupe V. Suarez, María B. Vecchione, Natalia Laufer, Diego Ameri, Graciela Ben, Hector Perez, Omar Sued, Horacio Salomón, et María F. Quiroga. 2017. « Expansion of CD25-Negative Forkhead Box P3-Positive T Cells during HIV and Mycobacterium Tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 8: 1234. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01234>.

- Infection ». *Frontiers in Immunology* 8 (mai): 528.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00528>.
- Auclair, Héloïse, Catherine Ouk-Martin, Lilian Roland, Pauline Santa, Hazar Al Mohamad, Nathalie Faumont, Jean Feuillard, et Chantal Jayat-Vignoles. 2019. « EBV Latency III–Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1–Dependent Manner ». *The Journal of Immunology* 203 (6): 1665-74.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801420>.
- Azar, Ali A., Alison M. Michie, Anuradha Tarafdar, Natasha Malik, Geetha K. Menon, Kathleen J. Till, Nikolina Vlatković, et Joseph R. Slusky. 2020. « A Novel Transgenic Mouse Strain Expressing PKC β II Demonstrates Expansion of B1 and Marginal Zone B Cell Populations ». *Scientific Reports* 10 (1): 13156. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70191-y>.
- Baens, Mathijs, Sabine Fevery, Xavier Sagaert, Heidi Noels, Sofie Hagens, Vicky Broeckx, An D. Billiau, Christiane De Wolf-Peeters, et Peter Marynen. 2006. « Selective Expansion of Marginal Zone B Cells in E μ -API2-MALT1 Mice Is Linked to Enhanced I κ B Kinase γ Polyubiquitination ». *Cancer Research* 66 (10): 5270-77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4590>.
- Baeuerle, P. A., et David Baltimore. 1988a. « Activation of DNA-Binding Activity in an Apparently Cytoplasmic Precursor of the NF-KB Transcription Factor ». *Cell* 53 (2): 211-17.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90382-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90382-0).
- . 1988b. « I Kappa B: A Specific Inhibitor of the NF-Kappa B Transcription Factor ». *Science* 242 (4878): 540-46. <https://doi.org/10.1126/science.3140380>.
- Balabanian, Karl, Emilie Brotin, Vincent Biajoux, Laurence Bouchet-Delbos, Elodie Lainey, Odile Fenneteau, Dominique Bonnet, Laurence Fiette, Dominique Emilie, et Françoise Bachelier. 2012. « Proper Desensitization of CXCR4 Is Required for Lymphocyte Development and Peripheral Compartmentalization in Mice ». *Blood* 119 (24): 5722-30.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403378>.
- Baracho, Gisele V., Matthew H. Cato, Zilu Zhu, Olav R. Jaren, Elias Hobeika, Michael Reth, et Robert C. Rickert. 2014. « PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (26): 9573-78.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1314562111>.
- Baron, Marine, Laurence Simon, Stéphanie Poulain, et Véronique Leblond. 2019. « How Recent Advances in Biology of Waldenström’s Macroglobulinemia May Affect Therapy Strategy ». *Current Oncology Reports* 21 (3): 27. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0768-4>.
- Basso, Katia, et Riccardo Dalla-Favera. 2015. « Germinal Centres and B Cell Lymphomagenesis ». *Nature Reviews Immunology* 15 (3): 172-84. <https://doi.org/10.1038/nri3814>.
- Baumgarth, Nicole. 2017. « A Hard(y) look at B-1 cell development and function* ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (10): 3387-94.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700943>.
- Bednar, Kyle J., Elena Shanina, Romain Ballet, Edward P. Connors, Shiteng Duan, Joana Juan, Britni M. Arlian, et al. 2017. « Human CD22 Inhibits Murine B Cell Receptor Activation in a Human CD22 Transgenic Mouse Model ». *The Journal of Immunology* 199 (9): 3116-28.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700898>.
- Beg, A. A., W. C. Sha, R. T. Bronson, et D. Baltimore. 1995. « Constitutive NF-Kappa B Activation, Enhanced Granulopoiesis, and Neonatal Lethality in I Kappa B Alpha-Deficient Mice ». *Genes & Development* 9 (22): 2736-46. <https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2736>.

- Beg, Amer A., William C. Sha, Roderick T. Bronson, Sankar Ghosh, et David Baltimore. 1995. « Embryonic Lethality and Liver Degeneration in Mice Lacking the RelA Component of NF-KB ». *Nature* 376 (6536): 167-70. <https://doi.org/10.1038/376167a0>.
- Bekiaris, Vasileios, David Withers, Stephanie H. Glanville, Fiona M. McConnell, Sonia M. Parnell, Mi-Yeon Kim, Fabrina M. C. Gaspal, et al. 2007. « Role of CD30 in B/T Segregation in the Spleen ». *The Journal of Immunology* 179 (11): 7535-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7535>.
- Bende, R. J., L. A. Smit, et C. J. M. van Noesel. 2007. « Molecular pathways in follicular lymphoma ». *Leukemia (08876924)* 21 (1): 18.
- Benson, Micah J., Stacey R. Dillon, Emanuela Castigli, Raif S. Geha, Shengli Xu, Kong-Peng Lam, et Randolph J. Noelle. 2008. « Cutting Edge: The Dependence of Plasma Cells and Independence of Memory B Cells on BAFF and APRIL ». *The Journal of Immunology* 180 (6): 3655-59. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3655>.
- Bishop, Gail A., Carissa R. Moore, Ping Xie, Laura L. Stunz, et Zachary J. Kraus. 2007. « TRAF Proteins in CD40 Signaling ». In *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*, édité par Hao Wu, 131-51. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_11.
- Bödör, Csaba, Donát Alpár, Dóra Marosvári, Bence Galik, Hajnalka Rajnai, Bence Bártai, Ákos Nagy, et al. 2020. « Molecular Subtypes and Genomic Profile of Primary Central Nervous System Lymphoma ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 79 (2): 176-83. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlz125>.
- Bohannon, Caitlin, Ryan Powers, Lakshmi Priyadarshini Satyabhama, Ang Cui, Christopher Tipton, Miri Michaeli, Ioanna Skountzou, et al. 2016. « Long-Lived Antigen-Induced IgM Plasma Cells Demonstrate Somatic Mutations and Contribute to Long-Term Protection ». *Nature Communications* 7 (juin): 11826. <https://doi.org/10.1038/ncomms11826>.
- Bonizzi, Giuseppina, et Michael Karin. 2004. « The Two NF-KB Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity ». *Trends in Immunology* 25 (6): 280-88. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>.
- Boothby, Mark R., Emily Hodges, et James W. Thomas. 2019. « Molecular Regulation of Peripheral B Cells and Their Progeny in Immunity ». *Genes & Development* 33 (1-2): 26-48. <https://doi.org/10.1101/gad.320192.118>.
- Bossen, Claudia, Teresa G. Cachero, Aubry Tardivel, Karine Ingold, Laure Willen, Max Dobles, Martin L. Scott, et al. 2008. « TACI, Unlike BAFF-R, Is Solely Activated by Oligomeric BAFF and APRIL to Support Survival of Activated B Cells and Plasmablasts ». *Blood* 111 (3): 1004-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110874>.
- Boxer, Linda M., et Chi V. Dang. 2001. « Translocations Involving C- Myc and c- Myc Function ». *Oncogene* 20 (40): 5595-5610. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204595>.
- Boyd, Scott D., et Shilpa A. Joshi. 2014. « High-Throughput DNA Sequencing Analysis of Antibody Repertoires ». *Microbiology Spectrum* 2 (5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0017-2014>.
- Brenner, Dirk, Heiko Blaser, et Tak W. Mak. 2015. « Regulation of Tumour Necrosis Factor Signalling: Live or Let Die ». *Nature Reviews Immunology* 15 (6): 362-74. <https://doi.org/10.1038/nri3834>.

- Bresin, A, L D'Abundo, M G Narducci, M T Fiorenza, C M Croce, M Negrini, et G Russo. 2016. « TCL1 Transgenic Mouse Model as a Tool for the Study of Therapeutic Targets and Microenvironment in Human B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Cell Death & Disease* 7 (1): e2071-e2071. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.419>.
- Bülow, Götz-Ulrich von, Jan M van Deursen, et Richard J Bram. 2001. « Regulation of the T-Independent Humoral Response by TACI ». *Immunity* 14 (5): 573-82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00130-3).
- Burkly, L., C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L. A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, et D. Lo. 1995. « Expression of RelB Is Required for the Development of Thymic Medulla and Dendritic Cells ». *Nature* 373 (6514): 531-36. <https://doi.org/10.1038/373531a0>.
- Caamaño, Jorge H., Cheryl A. Rizzo, Stephen K. Durham, Debra S. Barton, Carmen Raventós-Suárez, Clifford M. Snapper, et Rodrigo Bravo. 1998. « Nuclear Factor (NF)- κ B2 (p100/p52) Is Required for Normal Splenic Microarchitecture and B Cell-mediated Immune Responses ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (2): 185-96.
- Calado, Dinis Pedro, Baochun Zhang, Lakshmi Srinivasan, Yoshiteru Sasaki, Jane Seagal, Christine Unitt, Scott Rodig, et al. 2010. « Constitutive canonical NF- κ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma ». *Cancer cell* 18 (6): 580-89. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.024>.
- Camilleri-Broët, Sophie, Emmanuelle Crinière, Philippe Broët, Vincent Delwail, Karima Mokhtari, Anne Moreau, Michèle Kujas, et al. 2006. « A Uniform Activated B-Cell-like Immunophenotype Might Explain the Poor Prognosis of Primary Central Nervous System Lymphomas: Analysis of 83 Cases ». *Blood* 107 (1): 190-96. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1024>.
- Cao, Yixue, Giuseppina Bonizzi, Tiffany N. Seagroves, Florian R. Greten, Randall Johnson, Emmett V. Schmidt, et Michael Karin. 2001. « IKK α Provides an Essential Link between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression during Mammary Gland Development ». *Cell* 107 (6): 763-75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00599-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00599-2).
- Capasso, Melania, Mandeep K Bhamrah, Tom Henley, Robert S Boyd, Claudia Langlais, Kelvin Cain, David Dinsdale, et al. 2010. « HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species ». *Nature immunology* 11 (3): 265-72. <https://doi.org/10.1038/ni.1843>.
- Cariappa, A., H. C. Liou, B. H. Horwitz, et S. Pillai. 2000. « Nuclear Factor Kappa B Is Required for the Development of Marginal Zone B Lymphocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (8): 1175-82. <https://doi.org/10.1084/jem.192.8.1175>.
- Carragher, Damian, Ramneek Johal, Adele Button, Andrea White, Aristides Eliopoulos, Eric Jenkinson, Graham Anderson, et Jorge Caamaño. 2004. « A Stroma-Derived Defect in NF- κ B2-/- Mice Causes Impaired Lymph Node Development and Lymphocyte Recruitment ». *The Journal of Immunology* 173 (4): 2271-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2271>.
- Carrasco, Daniel, Janet Cheng, Anne Lewin, Glenn Warr, Hyekyung Yang, Cheryl Rizzo, Fabio Rosas, Clifford Snapper, et Rodrigo Bravo. 1998. « Multiple Hemopoietic Defects and Lymphoid Hyperplasia in Mice Lacking the Transcriptional Activation Domain of the c-Rel Protein ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (7): 973-84.
- Carrion, Claire, Estelle Guérin, Nathalie Gachard, Alexandre le Guyader, Stéphane Giraut, et Jean Feuillard. 2019. « Adult Bone Marrow Three-Dimensional Phenotypic Landscape of B-Cell Differentiation: ADULT BONE MARROW THREE-DIMENSIONAL PHENOTYPIC LANDSCAPE OF

- B-CELL DIFFERENTIATION ». *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 96 (1): 30-38.
<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21747>.
- Castigli, E, F W Alt, L Davidson, A Bottaro, E Mizoguchi, A K Bhan, et R S Geha. 1994. « CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25): 12135-39.
- Catalan-Dibene, Jovani, Laura L. McIntyre, et Albert Zlotnik. 2018. « Interleukin 30 to Interleukin 40 ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 38 (10): 423-39.
<https://doi.org/10.1089/jir.2018.0089>.
- Challa-Malladi, Madhavi, Yen K. Lieu, Olivia Califano, Antony Holmes, Govind Bhagat, Vundavalli V. Murty, David Dominguez-Sola, Laura Pasqualucci, et Riccardo Dalla-Favera. 2011. « Combined Genetic Inactivation of Beta2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B-cell Lymphoma ». *Cancer cell* 20 (6): 728-40.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.006>.
- Chan, Vivien W. F, Fanying Meng, Philippe Soriano, Anthony L DeFranco, et Clifford A Lowell. 1997. « Characterization of the B Lymphocyte Populations in Lyn-Deficient Mice and the Role of Lyn in Signal Initiation and Down-Regulation ». *Immunity* 7 (1): 69-81.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80511-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80511-7).
- Chanut, A., F. Duguet, A. Marfak, A. David, B. Petit, M. Parrens, S. Durand-Panteix, et al. 2014. « RelA and RelB Cross-Talk and Function in Epstein-Barr Virus Transformed B Cells ». *Leukemia* 28 (4): 871-79. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.274>.
- Cheah, Chan Y., Andrew Wirth, et John F. Seymour. 2014. « Primary Testicular Lymphoma ». *Blood* 123 (4): 486-93. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530659>.
- Chen, Benjamin J, Bjoern Chapuy, Jing Ouyang, Heather H Sun, Margaretha GM Roemer, Mina L Xu, Hongbo Yu, et al. 2013. « PD-L1 Expression is Characteristic of a Subset of Aggressive B-Cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (13): 3462-73.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0855>.
- Chen, J, R Lansford, V Stewart, F Young, et F W Alt. 1993. « RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (10): 4528-32.
- Chen, Nien-Jung, lok In Christine Chio, Wen-Jye Lin, Gordon Duncan, Hien Chau, David Katz, Huey-Lan Huang, et al. 2008. « Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (34): 12429-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806585105>.
- Chen, Yan, Yishu Yang, Min Sun, Zhuohong Yan, Lifeng Wu, Xiaoli Cui, Ge Zhang, Stephan W. Morris, et Quangeng Zhang. 2012. « Inhibition of Caspase-8 Activity Caused by Overexpression of Bcl10 Contributes to the Pathogenesis of High-Grade MALT Lymphoma ». *Pediatric Blood & Cancer* 58 (6): 865-71. <https://doi.org/10.1002/psc.23331>.
- Cheng, Alec M., Bruce Rowley, William Pao, Adrian Hayday, Joseph B. Bolen, et Tony Pawson. 1995. « Syk Tyrosine Kinase Required for Mouse Viability and B-Cell Development ». *Nature* 378 (6554): 303-6. <https://doi.org/10.1038/378303a0>.

- Cheng, Janet D., Rolf-Peter Ryseck, Ricardo M. Attar, Donna Dambach, et Rodrigo Bravo. 1998. « Functional Redundancy of the Nuclear Factor κ B Inhibitors I κ B α and I κ B β ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (6): 1055-62.
- Cheng, Shuhua, Constance Yu Hsia, Gustavo Leone, et Hsiou-Chi Liou. 2003. « Cyclin E and Bcl-x L Cooperatively Induce Cell Cycle Progression in c-Rel $-/-$ B Cells ». *Oncogene* 22 (52): 8472-86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206917>.
- Chien, Chien-Hui, et Bor-Luen Chiang. 2017. « Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells ». *Journal of Biomedical Science* 24 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0391-3>.
- Chu, Yuanyuan, Valeria Soberon, Laura Glockner, Rudi Beyaert, Ramin Massoumi, Geert van Loo, Daniel Krappmann, et Marc Schmidt-Supprian. 2012. « A20 and CYLD Do Not Share Significant Overlapping Functions during B Cell Development and Activation ». *The Journal of Immunology* 189 (9): 4437-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200396>.
- Chu, Yuanyuan, J. Christoph Vahl, Dilip Kumar, Klaus Heger, Arianna Bertossi, Edyta Wójtowicz, Valeria Soberon, et al. 2011. « B Cells Lacking the Tumor Suppressor TNFAIP3/A20 Display Impaired Differentiation and Hyperactivation and Cause Inflammation and Autoimmunity in Aged Mice ». *Blood* 117 (7): 2227-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306019>.
- Cildir, Gökhan, Kee Chung Low, et Vinay Tergaonkar. 2016. « Noncanonical NF- κ B Signaling in Health and Disease ». *Trends in Molecular Medicine* 22 (5): 414-29. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.03.002>.
- Corcoran, Anne E. 2005. « Immunoglobulin Locus Silencing and Allelic Exclusion ». *Seminars in Immunology* 17 (2): 141-54. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.01.002>.
- Corcoran, Anne E., Andrew Riddell, Danielle Krooshoop, et Ashok R. Venkitaraman. 1998. « Impaired Immunoglobulin Gene Rearrangement in Mice Lacking the IL-7 Receptor ». *Nature* 391 (6670): 904-7. <https://doi.org/10.1038/36122>.
- Couronne, L, E Bachy, S Roulland, B Nadel, F Davi, M Armand, D Canioni, et al. 2018. « From Hepatitis C Virus Infection to B-Cell Lymphoma ». *Annals of Oncology* 29 (1): 9.
- Damgaard, Rune Busk, Jennifer A. Walker, Paola Marco-Casanova, Neil V. Morgan, Hannah L. Titheradge, Paul R. Elliott, Duncan McHale, Eamonn R. Maher, Andrew N.J. McKenzie, et David Komander. 2016. « The Deubiquitinase OTULIN Is an Essential Negative Regulator of Inflammation and Autoimmunity ». *Cell* 166 (5): 1215-1230.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.019>.
- Danese, S., M. Sans, et C. Fiocchi. 2004. « The CD40/CD40L Costimulatory Pathway in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 53 (7): 1035-43. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026278>.
- David, Liron, Yang Li, Jun Ma, Ethan Garner, Xinzheng Zhang, et Hao Wu. 2018. « Assembly Mechanism of the CARMA1–BCL10–MALT1–TRAF6 Signalosome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (7): 1499-1504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721967115>.
- Deguine, Jacques, et Gregory M. Barton. 2014. « MyD88: a central player in innate immune signaling ». *F1000Prime Reports* 6 (novembre). <https://doi.org/10.12703/P6-97>.
- Delacroix, DI, et Jp Vaerman. 1985. « L'immunoglobuline A ». *médecine/sciences* 1 (7): 348. <https://doi.org/10.4267/10608/3377>.

- Dembinski, Holly E., Kevin Wismer, Jesse D. Vargas, Gajendra W. Suryawanshi, Nadja Kern, Gerard Kroon, H. Jane Dyson, Alexander Hoffmann, et Elizabeth A. Komives. 2017. « Functional importance of stripping in NFκB signaling revealed by a stripping-impaired IκBα mutant ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (8): 1916-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610192114>.
- Deng, Li, Chen Wang, Erika Spencer, Liyong Yang, Amy Braun, Jianxin You, Clive Slaughter, Cecile Pickart, et Zhijian J Chen. 2000. « Activation of the IκB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain », octobre, 11.
- Descatoire, Marc, Sandra Weller, Sabine Irtan, Sabine Sarnacki, Jean Feuillard, Sébastien Storck, Anne Guiochon-Mantel, et al. 2014. « Identification of a Human Splenic Marginal Zone B Cell Precursor with NOTCH2-Dependent Differentiation Properties ». *The Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 987-1000. <https://doi.org/10.1084/jem.20132203>.
- Dhillon, Bipandeep, Fatemah Aleithan, Zahi Abdul-Sater, et Ali A. Abdul-Sater. 2019. « The Evolving Role of TRAFs in Mediating Inflammatory Responses ». *Frontiers in Immunology* 10 (février): 104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00104>.
- Dogan, Ismail, Barbara Bertocci, Valérie Vilmont, Frédéric Delbos, Jérôme Mégret, Sébastien Storck, Claude-Agnès Reynaud, et Jean-Claude Weill. 2009. « Multiple Layers of B Cell Memory with Different Effector Functions ». *Nature Immunology* 10 (12): 1292-99. <https://doi.org/10.1038/ni.1814>.
- Dougall, William C., Moira Glaccum, Keith Charrier, Kathy Rohrbach, Kenneth Brasel, Thibaut De Smedt, Elizabeth Daro, et al. 1999. « RANK is essential for osteoclast and lymph node development ». *Genes & Development* 13 (18): 2412-24.
- Drayton, Danielle L., Shan Liao, Rawad H. Mounzer, et Nancy H. Ruddle. 2006. « Lymphoid Organ Development: From Ontogeny to Neogenesis ». *Nature Immunology* 7 (4): 344-53. <https://doi.org/10.1038/ni1330>.
- Du, Ming-Qing. 2016. « MALT Lymphoma: A Paradigm of NF-κB Dysregulation ». *Seminars in Cancer Biology*, B-cell malignancies – All roads lead to NF-κB activation, 39 (août): 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.07.003>.
- Dunn-Walters, Deborah, Catherine Townsend, Emma Sinclair, et Alex Stewart. 2018. « Immunoglobulin gene analysis as a tool for investigating human immune responses ». *Immunological Reviews* 284 (1): 132-47. <https://doi.org/10.1111/imr.12659>.
- Durand-Panteix, Stéphanie, Mona Farhat, Ibtissam Youlyouz-Marfak, Pauline Rouaud, Catherine Ouk-Martin, Amandine David, Nathalie Faumont, Jean Feuillard, et Chantal Jayat-Vignoles. 2012. « B7-H1, Which Represses EBV-Immortalized B Cell Killing by Autologous T and NK Cells, Is Oppositely Regulated by c-Myc and EBV Latency III Program at Both MRNA and Secretory Lysosome Levels ». *The Journal of Immunology* 189 (1): 181-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102277>.
- Early, P., H. Huang, M. Davis, K. Calame, et L. Hood. 1980. « An Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene Is Generated from Three Segments of DNA: VH, D and JH ». *Cell* 19 (4): 981-92. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90089-6).
- Edilova, Maria I., Ali A. Abdul-Sater, et Tania H. Watts. 2018. « TRAF1 Signaling in Human Health and Disease ». *Frontiers in Immunology* 9 (décembre): 2969. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02969>.

- Elgueta, Raul, Micah J. Benson, Victor C. de Vries, Anna Wasiuk, Yanxia Guo, et Randolph J. Noelle. 2009. « Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system ». *Immunological reviews* 229 (1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>.
- Espinete, Blanca, Beatriz Bellosillo, Carme Melero, M^a Carmen Vela, Carmen Pedro, Marta Salido, Lara Pijuan, et al. 2008. « FISH Is Better than BIOMED-2 PCR to Detect IgH/BCL2 Translocation in Follicular Lymphoma at Diagnosis Using Paraffin-Embedded Tissue Sections ». *Leukemia Research* 32 (5): 737-42. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.09.010>.
- Feldman, Amy G., Rebecca M. Tucker, Erika K. Fenner, Roberta Pelanda, et Cara L. Mack. 2013. « B Cell Deficient Mice Are Protected from Biliary Obstruction in the Rotavirus-Induced Mouse Model of Biliary Atresia ». *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073644>.
- Fischer, Thais, Natalia Pin Chuen Zing, Carlos Sergio Chiattonne, Massimo Federico, et Stefano Luminari. 2018. « Transformed Follicular Lymphoma ». *Annals of Hematology* 97 (1): 17-29. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3151-2>.
- Franzoso, G., L. Carlson, T. Scharton-Kersten, E. W. Shores, S. Epstein, A. Grinberg, T. Tran, et al. 1997. « Critical Roles for the Bcl-3 Oncoprotein in T Cell-Mediated Immunity, Splenic Microarchitecture, and Germinal Center Reactions ». *Immunity* 6 (4): 479-90. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80291-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80291-5).
- Franzoso, G., L. Carlson, L. Xing, L. Poljak, E. W. Shores, K. D. Brown, A. Leonardi, T. Tran, B. F. Boyce, et U. Siebenlist. 1997. « Requirement for NF-KappaB in Osteoclast and B-Cell Development ». *Genes & Development* 11 (24): 3482-96. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3482>.
- Franzoso, Guido, Louise Carlson, Ljiljana Poljak, Elizabeth W. Shores, Suzanne Epstein, Antonio Leonardi, Alex Grinberg, et al. 1998. « Mice Deficient in Nuclear Factor (NF)-κB/p52 Present with Defects in Humoral Responses, Germinal Center Reactions, and Splenic Microarchitecture ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (2): 147-59.
- Franzoso, Guido, Louise Carlson, Lianping Xing, Ljiljana Poljak, Elizabeth W. Shores, Keith D. Brown, Antonio Leonardi, Tom Tran, Brendan F. Boyce, et Ulrich Siebenlist. 1997. « Requirement for NF-κB in osteoclast and B-cell development ». *Genes & Development* 11 (24): 3482-96.
- Fruman, David A., Scott B. Snapper, Claudine M. Yballe, Laurie Davidson, Jonathan Y. Yu, Frederick W. Alt, et Lewis C. Cantley. 1999. « Impaired B Cell Development and Proliferation in Absence of Phosphoinositide 3-Kinase P85α ». *Science* 283 (5400): 393-97. <https://doi.org/10.1126/science.283.5400.393>.
- Fujita, Hiroaki, Akira Tokunaga, Satoshi Shimizu, Amanda L. Whiting, Francisco Aguilar-Alonso, Kenji Takagi, Erik Walinda, et al. 2018. « Cooperative Domain Formation by Homologous Motifs in HOIL-1L and SHARPIN Plays A Crucial Role in LUBAC Stabilization ». *Cell Reports* 23 (4): 1192-1204. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.112>.
- Fütterer, Agnes, Karin Mink, Arne Luz, Marie H. Kosco-Vilbois, et Klaus Pfeffer. 1998. « The Lymphotoxin β Receptor Controls Organogenesis and Affinity Maturation in Peripheral Lymphoid Tissues ». *Immunity* 9 (1): 59-70. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80588-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80588-9).
- Gachard, N., M. Parrens, I. Soubeyran, B. Petit, A. Marfak, D. Rizzo, M. Devesa, et al. 2013. « IGHV Gene Features and MYD88 L265P Mutation Separate the Three Marginal Zone Lymphoma Entities and Waldenström Macroglobulinemia/Lymphoplasmacytic Lymphomas ». *Leukemia* 27 (1): 183-89. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.257>.

- Galanina, Natalie, Justin Kline, et Michael R. Bishop. 2017. « Emerging Role of Checkpoint Blockade Therapy in Lymphoma ». *Therapeutic Advances in Hematology* 8 (2): 81-90. <https://doi.org/10.1177/2040620716673787>.
- Galler, Gunther R., Cornelia Mundt, Mathew Parker, Roberta Pelanda, Inga-Lill Mårtensson, et Thomas H. Winkler. 2004. « Surface μ Heavy Chain Signals Down-Regulation of the V(D)J-Recombinase Machinery in the Absence of Surrogate Light Chain Components ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (11): 1523-32. <https://doi.org/10.1084/jem.20031523>.
- Gardam, Sandra, Frederic Sierro, Antony Basten, Fabienne Mackay, et Robert Brink. 2008. « TRAF2 and TRAF3 Signal Adapters Act Cooperatively to Control the Maturation and Survival Signals Delivered to B Cells by the BAFF Receptor ». *Immunity* 28 (3): 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.009>.
- Gardam, Sandra, Vivian M. Turner, Holly Anderton, Sandhya Limaye, Antony Basten, Frank Koentgen, David L. Vaux, John Silke, et Robert Brink. 2011. « Deletion of CIAP1 and CIAP2 in Murine B Lymphocytes Constitutively Activates Cell Survival Pathways and Inactivates the Germinal Center Response ». *Blood* 117 (15): 4041-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312793>.
- Gaspal, Fabrina M. C., Mi-Yeon Kim, Fiona M. McConnell, Chandra Raykundalia, Vasilios Bekiaris, et Peter J. L. Lane. 2005. « Mice Deficient in OX40 and CD30 Signals Lack Memory Antibody Responses Because of Deficient CD4 T Cell Memory ». *The Journal of Immunology* 174 (7): 3891-96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.3891>.
- Gay, Nicholas J., et Fionna J. Keith. 1991. « Drosophila Toll and IL-1 Receptor ». *Nature* 351 (6325): 355-56. <https://doi.org/10.1038/351355b0>.
- Gayet, Mylene, Vincent Leymarie, Paco Derouault, Estelle Guérin, Julien Vaidié, Virginie Pascal, Mélanie Boulin, et al. 2021. « Flow Cytometry Detection of CD138 Expression Continuum between Monotypic B and Plasma Cells Is Associated with Both High IgM Peak Levels and MYD88 Mutation and Contributes to Diagnosis of Waldenström Macroglobulinemia ». *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21995>.
- Geisberger, Roland, Marinus Lamers, et Gernot Achatz. 2006. « The Riddle of the Dual Expression of IgM and IgD ». *Immunology* 118 (4): 429-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x>.
- Gerlach, Björn, Stefanie M. Cordier, Anna C. Schmukle, Christoph H. Emmerich, Eva Rieser, Tobias L. Haas, Andrew I. Webb, et al. 2011. « Linear Ubiquitination Prevents Inflammation and Regulates Immune Signalling ». *Nature* 471 (7340): 591-96. <https://doi.org/10.1038/nature09816>.
- Giaccone, Giuseppe, et Jean-Charles Soria. 2013. *Targeted Therapies in Oncology, Second Edition*. CRC Press.
- Giannuzzi, Diana, Luca Giudice, Laura Marconato, Serena Ferraresso, Rosalba Giugno, Francesco Bertoni, et Luca Aresu. 2020. « Integrated Analysis of Transcriptome, Methylome and Copy Number Aberrations Data of Marginal Zone Lymphoma and Follicular Lymphoma in Dog ». *Veterinary and Comparative Oncology* 18 (4): 645-55. <https://doi.org/10.1111/vco.12588>.
- Gong, Shiaoqing, et Michel C. Nussenzweig. 1996. « Regulation of an Early Developmental Checkpoint in the B Cell Pathway by Ig β ». *Science* 272 (5260): 411-14. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.411>.

- Goodman, Aaron, Sandip P. Patel, et Razelle Kurzrock. 2017. « PD-1–PD-L1 Immune-Checkpoint Blockade in B-Cell Lymphomas ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 14 (4): 203-20. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.168>.
- Goudeau, Bertrand, François Huetz, Sandrine Samson, James P. Di Santo, Ana Cumano, Amer Beg, Alain Israël, et Sylvie Mémet. 2003. « IkappaBalpha/IkappaBepsilon Deficiency Reveals That a Critical NF-KappaB Dosage Is Required for Lymphocyte Survival ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15800-805. <https://doi.org/10.1073/pnas.2535880100>.
- Grant, Spencer M., Meng Lou, Li Yao, Ronald N. Germain, et Andrea J. Radtke. 2020. « The Lymph Node at a Glance – How Spatial Organization Optimizes the Immune Response ». *Journal of Cell Science* 133 (5). <https://doi.org/10.1242/jcs.241828>.
- Grech, Adrian P., Michelle Amesbury, Tyani Chan, Sandra Gardam, Antony Basten, et Robert Brink. 2004. « TRAF2 Differentially Regulates the Canonical and Noncanonical Pathways of NF-KB Activation in Mature B Cells ». *Immunity* 21 (5): 629-42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.011>.
- Green, Michael R., Andrew J. Gentles, Ramesh V. Nair, Jonathan M. Irish, Shingo Kihira, Chih Long Liu, Itai Kela, et al. 2013. « Hierarchy in Somatic Mutations Arising during Genomic Evolution and Progression of Follicular Lymphoma ». *Blood* 121 (9): 1604-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457283>.
- Green, Michael R., Scott Rodig, Przemyslaw Juszczynski, Jing Ouyang, Papiya Sinha, Evan O'Donnell, Donna Neuberg, et Margaret A. Shipp. 2012. « Constitutive AP-1 Activity and EBV Infection Induce PD-L1 in Hodgkin Lymphomas and Post-transplant Lymphoproliferative Disorders: Implications for Targeted Therapy ». *Clinical Cancer Research* 18 (6): 1611-18. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1942>.
- Groen, Ruben A.L. de, Anne M.R. Schrader, Marie José Kersten, Steven T. Pals, et Joost S.P. Vermaat. 2019. « MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications ». *Haematologica* 104 (12): 2337-48. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.227272>.
- Grossmann, Mathis, Donald Metcalf, Julie Merryfull, Amer Beg, David Baltimore, et Steve Gerondakis. 1999. « The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (21): 11848-53.
- Grossmann, Mathis, Lorraine A. O'Reilly, Raffi Gugasyan, Andreas Strasser, Jerry M. Adams, et Steve Gerondakis. 2000. « The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression ». *The EMBO Journal* 19 (23): 6351-60. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6351>.
- Grumont, Raelene J., Ian J. Rourke, Lorraine A. O'Reilly, Andreas Strasser, Kensuke Miyake, William Sha, et Steve Gerondakis. 1998. « B Lymphocytes Differentially Use the Rel and Nuclear Factor κ B1 (NF- κ B1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-activated Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (5): 663-74.
- Grumont, Raelene J., Andreas Strasser, et Steve Gerondakis. 2002. « B Cell Growth Is Controlled by Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Induction of Rel/NF-KappaB Regulated c-Myc Transcription ». *Molecular Cell* 10 (6): 1283-94. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00779-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00779-7).

- Guerrera, Maria Luisa, Nickolas Tsakmaklis, Lian Xu, Guang Yang, Maria Demos, Amanda Kofides, Gloria G. Chan, et al. 2018. « *MYD88* Mutated and Wild-Type Waldenström's Macroglobulinemia: Characterization of Chromosome 6q Gene Losses and Their Mutual Exclusivity with Mutations in *CXCR4* ». *Haematologica* 103 (9): e408-11. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.190181>.
- Gugasyan, Raffi, Anne Voss, George Varigos, Tim Thomas, Raelene J. Grumont, Pritinder Kaur, George Grigoriadis, et Steve Gerondakis. 2004. « The Transcription Factors c-rel and RelA Control Epidermal Development and Homeostasis in Embryonic and Adult Skin via Distinct Mechanisms ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (13): 5733-45. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5733-5745.2004>.
- Hahn, Matthias, Anna Macht, Ari Waisman, et Nadine Hövelmeyer. 2016. « NF- κ B-inducing kinase is essential for B-cell maintenance in mice ». *European Journal of Immunology* 46 (3): 732-41. <https://doi.org/10.1002/eji.201546081>.
- Harhaj, Edward W, et Vishva M Dixit. 2011. « Deubiquitinases in the Regulation of NF-KB Signaling ». *Cell Research* 21 (1): 22-39. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.166>.
- Harris, A. W., C. A. Pinkert, M. Crawford, W. Y. Langdon, R. L. Brinster, et J. M. Adams. 1988. « The E Mu-Myc Transgenic Mouse. A Model for High-Incidence Spontaneous Lymphoma and Leukemia of Early B Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 167 (2): 353-71. <https://doi.org/10.1084/jem.167.2.353>.
- Hayakawa, K, R. R. Hardy, D. R. Parks, et L. A. Herzenberg. 1983. « The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 157 (1): 202-18.
- Hayashi, Elize A., Shizuo Akira, et Alberto Nobrega. 2005. « Role of TLR in B Cell Development: Signaling through TLR4 Promotes B Cell Maturation and Is Inhibited by TLR2 ». *The Journal of Immunology* 174 (11): 6639-47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6639>.
- Hayden, Matthew S., et Sankar Ghosh. 2004. « Signaling to NF-KB ». *Genes & Development* 18 (18): 2195-2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>.
- . 2008. « Shared Principles in NF-KB Signaling ». *Cell* 132 (3): 344-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>.
- . 2014. « Regulation of NF-KB by TNF Family Cytokines ». *Seminars in Immunology, The TNF family - challenges ahead*, 26 (3): 253-66. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>.
- Heise, Nicole, Nilushi S. De Silva, Kathryn Silva, Amanda Carette, Giorgia Simonetti, Manolis Pasparakis, et Ulf Klein. 2014. « Germinal Center B Cell Maintenance and Differentiation Are Controlled by Distinct NF-KB Transcription Factor Subunits ». *The Journal of Experimental Medicine* 211 (10): 2103-18. <https://doi.org/10.1084/jem.20132613>.
- Hilger, Daniel, Matthieu Masureel, et Brian K. Kobilka. 2018. « Structure and dynamics of GPCR signaling complexes ». *Nature structural & molecular biology* 25 (1): 4-12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>.
- Hoffmann, A., G. Natoli, et G. Ghosh. 2006. « Transcriptional Regulation via the NF- κ B Signaling Module ». *Oncogene* 25 (51): 6706-16. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>.
- Hömig-Hölzel, Cornelia, Caroline Hojer, Julia Rastelli, Stefano Casola, Lothar J. Strobl, Werner Müller, Leticia Quintanilla-Martinez, et al. 2008. « Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF- κ B pathway and promotes lymphomagenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (6): 1317-29. <https://doi.org/10.1084/jem.20080238>.

- Hornig, Tiffany, Gregory M. Barton, Richard A. Flavell, et Ruslan Medzhitov. 2002. « The Adaptor Molecule TIRAP Provides Signalling Specificity for Toll-like Receptors ». *Nature* 420 (6913): 329-33. <https://doi.org/10.1038/nature01180>.
- Horton, Sarah J., George Giotopoulos, Haiyang Yun, Shabana Vohra, Olivia Sheppard, Rachael Bashford-Rogers, Mamunur Rashid, et al. 2017. « Early Loss of Crebbp Confers Malignant Stem Cell Properties on Lymphoid Progenitors ». *Nature Cell Biology* 19 (9): 1093-1104. <https://doi.org/10.1038/ncb3597>.
- Horwitz, Bruce H, Martin L Scott, Sara R Cherry, Roderick T Bronson, et David Baltimore. 1997. « Failure of Lymphopoiesis after Adoptive Transfer of NF-KB-Deficient Fetal Liver Cells ». *Immunity* 6 (6): 765-72. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80451-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80451-3).
- Hoshino, Katsuaki, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Hideki Sanjo, Tomohiko Ogawa, Yoshifumi Takeda, Kiyoshi Takeda, et Shizuo Akira. 1999. « Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product ». *The Journal of Immunology* 162 (7): 3749-52.
- Hövelmeyer, Nadine, Sonja Reissig, Nguyen Thi Xuan, Petra Adams-Quack, Dominika Lukas, Alexei Nikolaev, Dirk Schlüter, et Ari Waisman. 2011. « A20 Deficiency in B Cells Enhances B-Cell Proliferation and Results in the Development of Autoantibodies ». *European Journal of Immunology* 41 (3): 595-601. <https://doi.org/10.1002/eji.201041313>.
- Hövelmeyer, Nadine, Marcus A. Wörns, Sonja Reissig, Petra Adams-Quack, Jennifer Leclaire, Matthias Hahn, Simone Wörtge, Alexei Nikolaev, Peter R. Galle, et Ari Waisman. 2014. « Overexpression of Bcl-3 Inhibits the Development of Marginal Zone B Cells ». *European Journal of Immunology* 44 (2): 545-52. <https://doi.org/10.1002/eji.201343655>.
- Hsieh, Chyi-Song, Ye Zheng, Yuqiong Liang, Jason D. Fontenot, et Alexander Y. Rudensky. 2006. « An Intersection between the Self-Reactive Regulatory and Nonregulatory T Cell Receptor Repertoires ». *Nature Immunology* 7 (4): 401-10. <https://doi.org/10.1038/ni1318>.
- Hu, Yinling, Véronique Baud, Mireille Delhase, Peilin Zhang, Thomas Deerinck, Mark Ellisman, Randall Johnson, et Michael Karin. 1999. « Abnormal Morphogenesis But Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKK α Subunit of I κ B Kinase ». *Science* 284 (5412): 316-20. <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.316>.
- Huang, Yingsu, Tao Li, David C. Sane, et Liwu Li. 2004. « IRAK1 Serves as a Novel Regulator Essential for Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-10 Gene Expression ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (49): 51697-703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410369200>.
- Huemer, Florian, Michael Leisch, Roland Geisberger, Thomas Melchardt, Gabriel Rinnerthaler, Nadja Zaborsky, et Richard Greil. 2020. « Combination Strategies for Immune-Checkpoint Blockade and Response Prediction by Artificial Intelligence ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082856>.
- Hug, E., E. Hobeika, M. Reth, et H. Jumaa. 2014. « Inducible Expression of Hyperactive Syk in B Cells Activates Blimp-1-Dependent Terminal Differentiation ». *Oncogene* 33 (28): 3730-41. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.326>.
- Hultmark, D. 1994. « Macrophage Differentiation Marker MyD88 Is a Member of the Toll/IL-1 Receptor Family ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (1): 144-46. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1206>.
- Hunter, Zachary R., Lian Xu, Guang Yang, Yangsheng Zhou, Xia Liu, Yang Cao, Robert J. Manning, et al. 2014. « The Genomic Landscape of Waldenström Macroglobulinemia Is Characterized by

- Highly Recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 Mutations, and Small Somatic Deletions Associated with B-Cell Lymphomagenesis ». *Blood* 123 (11): 1637-46.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-525808>.
- Hunter, Zachary R., Guang Yang, Lian Xu, Xia Liu, Jorge J. Castillo, et Steven P. Treon. 2017.
« Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia ». *Journal of Clinical Oncology* 35 (9): 994-1001. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0814>.
- Huse, Morgan. 2009. « The T-Cell-Receptor Signaling Network ». *Journal of Cell Science* 122 (9): 1269-73. <https://doi.org/10.1242/jcs.042762>.
- Ishikawa, Hideaki, Daniel Carrasco, Estefania Claudio, Rolf-Peter Ryseck, et Rodrigo Bravo. 1997.
« Gastric Hyperplasia and Increased Proliferative Responses of Lymphocytes in Mice Lacking the COOH-terminal Ankyrin Domain of NF- κ B ». *The Journal of Experimental Medicine* 186 (7): 999-1014.
- Ishikawa, Hideaki, Estefania Claudio, Donna Dambach, Carmen Raventós-Suárez, Carol Ryan, et Rodrigo Bravo. 1998. « Chronic Inflammation and Susceptibility to Bacterial Infections in Mice Lacking the Polypeptide (p)105 Precursor (NF- κ B1) but Expressing p50 ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (7): 985-96.
- Israël, A. 1997. « Signal Transduction. IkappaB Kinase All Zipped Up ». *Nature* 388 (6642): 519-21.
<https://doi.org/10.1038/41433>.
- Jäger, U., S. Böcskő, T. Le, G. Mitterbauer, I. Bolz, A. Chott, M. Kneba, C. Mannhalter, et B. Nadel. 2000. « Follicular Lymphomas' BCL-2/IgH Junctions Contain Templated Nucleotide Insertions: Novel Insights into the Mechanism of t(14;18) Translocation ». *Blood* 95 (11): 3520-29.
- Jalali, Shahrzad, Tammy Price-Troska, Jonas Paludo, Jose Villasboas, Hyo-Jin Kim, Zhi-Zhang Yang, Anne J. Novak, et Stephen M. Ansell. 2018. « Soluble PD-1 Ligands Regulate T-Cell Function in Waldenstrom Macroglobulinemia ». *Blood Advances* 2 (15): 1985-97.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021113>.
- Jefferies, Caroline A., Sarah Doyle, Cornelia Brunner, Aisling Dunne, Elizabeth Brint, Claudia Wietek, Eva Walch, Thomas Wirth, et Luke A. J. O'Neill. 2003. « Bruton's Tyrosine Kinase Is a Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-Binding Protein That Participates in Nuclear Factor KappaB Activation by Toll-like Receptor 4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 26258-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301484200>.
- Jenks, Scott A., Kevin S. Cashman, Matthew C. Woodruff, F. Eun-Hyung Lee, et Ignacio Sanz. 2019.
« Extrafollicular responses in humans and SLE ». *Immunological reviews* 288 (1): 136-48.
<https://doi.org/10.1111/imr.12741>.
- Jiang, Xiang-Nan, Bao-Hua Yu, Wan-Hui Yan, Jimmy Lee, Xiao-Yan Zhou, et Xiao-Qiu Li. 2019.
« Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma features disrupted antigen capture/presentation and hijacked T-cell suppression ». *Oncoimmunology* 9 (1).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683346>.
- Jin, Wei, William R. Reiley, Andrew J. Lee, Ato Wright, Xuefeng Wu, Minying Zhang, et Shao-Cong Sun. 2007. « Deubiquitinating Enzyme CYLD Regulates the Peripheral Development and Naive Phenotype Maintenance of B Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15884-93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609952200>.
- Jo, Tomoyasu, Momoko Nishikori, Yasunori Kogure, Hiroshi Arima, Katsuhiko Sasaki, Yoshiteru Sasaki, Tomoko Nakagawa, et al. 2020. « LUBAC Accelerates B-Cell Lymphomagenesis by Conferring

- Resistance to Genotoxic Stress on B Cells ». *Blood* 136 (6): 684-97.
<https://doi.org/10.1182/blood.2019002654>.
- Josefowicz, Steven Z., Li-Fan Lu, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function ». *Annual review of immunology* 30: 531-64.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>.
- K. Abbas, Abul, et Andrew H. Lichtman. 2009. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*.
<https://www.decitre.fr/livres/les-bases-de-l-immunologie-fondamentale-et-clinique-9782842996734.html>.
- Kageyama, Yuki, et Naoyuki Katayama. 2020. « Ontogeny of Human B1 Cells ». *International Journal of Hematology* 111 (5): 628-33. <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02775-y>.
- Kaisho, Tsuneyasu, Kiyoshi Takeda, Tohru Tsujimura, Taro Kawai, Fumiko Nomura, Nobuyuki Terada, et Shizuo Akira. 2001. « Ikb Kinase α Is Essential for Mature B Cell Development and Function ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (4): 417-26.
- Kalpaktsoglou, P. K., R. Hong, et R. A. Good. 1973. « The five classes of immunoglobulins in normal C3H and BALB/c mice ». *Immunology* 24 (2): 303-14.
- Karkhah, Ahmad, Soheil Ebrahimpour, Maryam Rostamtabar, Veerendra Koppolu, Sorena Darvish, Veneela Krishna Rekha Vasigala, Majid Validi, et Hamid Reza Nouri. 2019. « Helicobacter Pylori Evasion Strategies of the Host Innate and Adaptive Immune Responses to Survive and Develop Gastrointestinal Diseases ». *Microbiological Research* 218 (janvier): 49-57.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.011>.
- Kawai, Taro, Osamu Adachi, Tomohiko Ogawa, Kiyoshi Takeda, et Shizuo Akira. 1999. « Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin ». *Immunity* 11 (1): 115-22.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80086-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80086-2).
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2009. « The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition ». *International Immunology* 21 (4): 317-37. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>.
- Kelliher, Michelle A, Stefan Grimm, Yasumasa Ishida, Frank Kuo, Ben Z Stanger, et Philip Leder. 1998. « The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF-KB Signal ». *Immunity* 8 (3): 297-303. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80535-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80535-X).
- Kerner, James D., Mark W. Appleby, Randolph N. Mohr, Sylvia Chien, David J. Rawlings, Charles R. Maliszewski, Owen N. Witte, et Roger M. Perlmutter. 1995. « Impaired Expansion of Mouse B Cell Progenitors Lacking Btk ». *Immunity* 3 (3): 301-12. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90115-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90115-9).
- Khan, Wasif N., Frederick W. Alt, Rachel M. Gerstein, Barbara A. Malynn, Irene Larsson, Gary Rathbun, Laurie Davidson, et al. 1995. « Defective B Cell Development and Function in Btk-Deficient Mice ». *Immunity* 3 (3): 283-99. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90114-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90114-0).
- Khodabakhshi, Alireza Hadj, Ryan D. Morin, Anthony P. Fejes, Andrew J. Mungall, Karen L. Mungall, Madison Bolger-Munro, Nathalie A. Johnson, et al. 2012. « Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma ». *Oncotarget* 3 (11): 1308-19.
- Kil, Laurens P., Marjolein J. W. de Bruijn, Menno van Nimwegen, Odilia B. J. Corneth, Jan Piet van Hamburg, Gemma M. Dingjan, Friedrich Thaiss, et al. 2012. « Btk Levels Set the Threshold for B-Cell Activation and Negative Selection of Autoreactive B Cells in Mice ». *Blood* 119 (16): 3744-56. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397919>.

- Kim, Dongku, Reina E. Mebius, John D. MacMicking, Steffen Jung, Tom Cupedo, Yaneth Castellanos, Jaerang Rho, et al. 2000. « Regulation of Peripheral Lymph Node Genesis by the Tumor Necrosis Factor Family Member Trance ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (10): 1467-78.
- Kim, Shinyop, Ross N. A. La Motte-Mohs, Dorothea Rudolph, Juan Carlos Zúñiga-Pflücker, et Tak W. Mak. 2003. « The role of nuclear factor- κ B essential modulator (NEMO) in B cell development and survival ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3): 1203-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337707100>.
- Kiyasu, Junichi, Hiroaki Miyoshi, Akie Hirata, Fumiko Arakawa, Ayako Ichikawa, Daisuke Niino, Yasuo Sugita, et al. 2015. « Expression of Programmed Cell Death Ligand 1 Is Associated with Poor Overall Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma ». *Blood* 126 (19): 2193-2201. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629600>.
- Knies, Nathalie, Begüm Alankus, Andre Weilemann, Alexandar Tzankov, Kristina Brunner, Tanja Ruff, Marcus Kremer, Ulrich B. Keller, Georg Lenz, et Jürgen Ruland. 2015. « Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (52): E7230-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507459112>.
- Knittel, Gero, Paul Liedgens, Darya Korovkina, Jens M. Seeger, Yussor Al-Baldawi, Mona Al-Maarri, Christian Fritz, et al. 2016. « B-Cell–Specific Conditional Expression of Myd88p.L252P Leads to the Development of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Mice ». *Blood* 127 (22): 2732-41. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-684183>.
- Kober-Hasslacher, Maike, Hyunju Oh-Strauß, Dilip Kumar, Valeria Soberon, Carina Diehl, Maciej Lech, Thomas Engleitner, et al. 2020. « C-Rel Gain in B Cells Drives Germinal Center Reactions and Autoantibody Production ». *The Journal of Clinical Investigation* 130 (6): 3270-86. <https://doi.org/10.1172/JCI124382>.
- Kong, Young-Yun, Hiroki Yoshida, Ildiko Sarosi, Hong-Lin Tan, Emma Timms, Casey Capparelli, Sean Morony, et al. 1999. « OPGL Is a Key Regulator of Osteoclastogenesis, Lymphocyte Development and Lymph-Node Organogenesis ». *Nature* 397 (6717): 315-23. <https://doi.org/10.1038/16852>.
- Kridel, Robert, Fong Chun Chan, Anja Mottok, Merrill Boyle, Pedro Farinha, King Tan, Barbara Meissner, et al. 2016. « Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study ». *PLoS Medicine* 13 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002197>.
- Kridel, Robert, Laurie H Sehn, et Randy D Gascoyne. 2017. « Can Histologic Transformation of Follicular Lymphoma Be Predicted and Prevented? » 130 (3): 9.
- Krysiak, Kilannin, Felicia Gomez, Brian S. White, Matthew Matlock, Christopher A. Miller, Lee Trani, Catrina C. Fronick, et al. 2017. « Recurrent Somatic Mutations Affecting B-Cell Receptor Signaling Pathway Genes in Follicular Lymphoma ». *Blood* 129 (4): 473-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-729954>.
- Kucuksayan H, Hakan, et Sakir Akgun S. 2016. « PI3K/Akt/NF-KB Signalling Pathway on NSCLC Invasion ». *Medicinal Chemistry* 06 (04). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000351>.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, et K. Rajewsky. 1995. « Inducible Gene Targeting in Mice ». *Science* 269 (5229): 1427-29. <https://doi.org/10.1126/science.7660125>.

- Kuka, Mirela, et Matteo Iannacone. 2018. « Viral Subversion of B Cell Responses within Secondary Lymphoid Organs ». *Nature Reviews Immunology* 18 (4): 255-65.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.133>.
- Kulwichit, Wanla, Rachel Hood Edwards, Ethan M. Davenport, John F. Baskar, Virginia Godfrey, et Nancy Raab-Traub. 1998. « Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (20): 11963-68.
- Küppers, Ralf. 2005. « Mechanisms of B-Cell Lymphoma Pathogenesis ». *Nature Reviews Cancer* 5 (4): 251-62. <https://doi.org/10.1038/nrc1589>.
- Küppers, Ralf, Andreas Engert, et Martin-Leo Hansmann. 2012. « Hodgkin lymphoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (10): 3439-47. <https://doi.org/10.1172/JCI61245>.
- Kuzume, Ayumi, SungGi Chi, Nobuhiko Yamauchi, et Yosuke Minami. 2020. « Immune-Checkpoint Blockade Therapy in Lymphoma ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15).
<https://doi.org/10.3390/ijms21155456>.
- Lackraj, Tracy, Rashmi Goswami, et Robert Kridel. 2018. « Pathogenesis of Follicular Lymphoma ». *Best Practice & Research Clinical Haematology* 31 (1): 2-14.
<https://doi.org/10.1016/j.beha.2017.10.006>.
- Ladetto, Marco, Daniela Drandi, Mara Compagno, Monica Astolfi, Federica Volpato, Claudia Voena, Anna Novarino, et al. 2003. « PCR-Detectable Nonneoplastic *Bcl-2* / *IgH* Rearrangements Are Common in Normal Subjects and Cancer Patients at Diagnosis but Rare in Subjects Treated With Chemotherapy ». *Journal of Clinical Oncology* 21 (7): 1398-1403.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.07.070>.
- Lam, Lloyd T., George Wright, R. Eric Davis, Georg Lenz, Pedro Farinha, Lenny Dang, John W. Chan, Andreas Rosenwald, Randy D. Gascoyne, et Louis M. Staudt. 2008. « Cooperative Signaling through the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Nuclear Factor- κ B Pathways in Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma ». *Blood* 111 (7): 3701-13.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-111948>.
- Lamprecht Tratar, Ursa, Simon Horvat, et Maja Cemazar. 2018. « Transgenic Mouse Models in Cancer Research ». *Frontiers in Oncology* 8 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00268>.
- Laurent, Camille, Konstantina Charmpi, Pauline Gravelle, Marie Tosolini, Camille Franchet, Loïc Ysebaert, Pierre Brousset, Alexandre Bidaut, Bernard Ycart, et Jean-Jacques Fournié. 2015. « Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas ». *Oncoimmunology* 4 (8).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1026530>.
- Lavrik, I. 2005. « Death Receptor Signaling ». *Journal of Cell Science* 118 (2): 265-67.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01610>.
- Lee, Eric G., David L. Boone, Sophia Chai, Shon L. Libby, Marcia Chien, James P. Lodolce, et Averil Ma. 2000. « Failure to Regulate TNF-Induced NF- κ B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488): 2350-54.
- Lee, Koon-Guan, Shengli Xu, Zi-Han Kang, Jianxin Huo, Mei Huang, Dingxiang Liu, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, et Kong-Peng Lam. 2012. « Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (15): 5791-96.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1119238109>.

- Lee, Michelle Sue Jann, Yayoi Natsume-Kitatani, Burcu Temizoz, Yukiko Fujita, Aki Konishi, Kyoko Matsuda, Yoshikatsu Igari, et al. 2019. « B Cell-Intrinsic MyD88 Signaling Controls IFN- γ -Mediated Early IgG2c Class Switching in Mice in Response to a Particulate Adjuvant ». *European Journal of Immunology* 49 (9): 1433-40. <https://doi.org/10.1002/eji.201848084>.
- Lee, Soo Young, Amy Reichlin, Angela Santana, Karen A Sokol, Michel C Nussenzweig, et Yongwon Choi. 1997. « TRAF2 Is Essential for JNK but Not NF-KB Activation and Regulates Lymphocyte Proliferation and Survival ». *Immunity* 7 (5): 703-13. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80390-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80390-8).
- Leitges, Michael, Christian Schmedt, Rodolphe Guinamard, Jean Davoust, Stefan Schaal, Silvia Stabel, et Alexander Tarakhovsky. 1996. « Immunodeficiency in Protein Kinase C β -Deficient Mice ». *Science* 273 (5276): 788-91. <https://doi.org/10.1126/science.273.5276.788>.
- Lens, Susanne M. A., Paul Drillenbourg, Bianca F. A. Den Drijver, Gijs Van Schijndel, Steven T. Pals, René A. W. Van Lier, et Marinus H. J. Van Oers. 1999. « Aberrant Expression and Reverse Signalling of CD70 on Malignant B Cells ». *British Journal of Haematology* 106 (2): 491-503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01573.x>.
- Li, Li, Jun Zhang, Juan Chen, Zijun Y. Xu-Monette, Yi Miao, Min Xiao, Ken H. Young, et al. 2018. « B-Cell Receptor-Mediated NFATc1 Activation Induces IL-10/STAT3/PD-L1 Signaling in Diffuse Large B-Cell Lymphoma ». *Blood* 132 (17): 1805-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-841015>.
- Li, Qiutang, Qingxian Lu, Jason Y. Hwang, Dirk Büscher, Kuo-Fen Lee, Juan Carlos Izpisua-Belmonte, et Inder M. Verma. 1999. « IKK1-Deficient Mice Exhibit Abnormal Development of Skin and Skeleton ». *Genes & Development* 13 (10): 1322-28.
- Li, Zhaoyang, Hongsheng Wang, Liquan Xue, Dong-Mi Shin, Derry Roopenian, Wu Xu, Chen-Feng Qi, et al. 2009. « Emu-BCL10 Mice Exhibit Constitutive Activation of Both Canonical and Noncanonical NF-KappaB Pathways Generating Marginal Zone (MZ) B-Cell Expansion as a Precursor to Splenic MZ Lymphoma ». *Blood* 114 (19): 4158-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192583>.
- Li, Zhi-Wei, Wenming Chu, Yinling Hu, Mireille Delhase, Tom Deerinck, Mark Ellisman, Randall Johnson, et Michael Karin. 1999. « The IKK β Subunit of I κ B Kinase (IKK) is Essential for Nuclear Factor κ B Activation and Prevention of Apoptosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11): 1839-45.
- Li, Zhi-Wei, Sidne A. Omori, Tord Labuda, Michael Karin, et Robert C. Rickert. 2003. « IKK β Is Required for Peripheral B Cell Survival and Proliferation ». *The Journal of Immunology* 170 (9): 4630-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4630>.
- Liang, Yanhua. 2011. « Chronic Proliferative Dermatitis in Mice: NF κ B Activation Autoinflammatory Disease ». *Pathology Research International* 2011 (juin). <https://doi.org/10.4061/2011/936794>.
- Libby, Peter. 2007. « Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease ». *Nutrition Reviews* 65 (12 Pt 2): S140-146. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>.
- Lin, Ningjing, Yuqin Song, et Jun Zhu. 2020. « Immune checkpoint inhibitors in malignant lymphoma: Advances and perspectives ». *Chinese Journal of Cancer Research* 32 (3): 303-18. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.03.03>.

- Lin, Su-Chang, Yu-Chih Lo, et Hao Wu. 2010. « Helical Assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 Complex in TLR/IL-1R Signalling ». *Nature* 465 (7300): 885-90. <https://doi.org/10.1038/nature09121>.
- Lin, Zhijie, Jing Lu, Weihong Zhou, et Yuequan Shen. 2012. « Structural Insights into TIR Domain Specificity of the Bridging Adaptor Mal in TLR4 Signaling ». *PLoS ONE* 7 (4): 12.
- Liu, Yong-Jun, Gerald D Johnson, John Gordon, et Ian C.M MacLennan. 1992. « Germinal Centres in T-Cell-Dependent Antibody Responses ». *Immunology Today* 13 (1): 17-21. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90199-H](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90199-H).
- Lo, James C., Soumen Basak, Ethan S. James, Raechel S. Quiambo, Marcus C. Kinsella, Maria-Luisa Alegre, Falk Weih, Guido Franzoso, Alexander Hoffmann, et Yang-Xin Fu. 2006. « Coordination between NF-KappaB Family Members P50 and P52 Is Essential for Mediating LTbetaR Signals in the Development and Organization of Secondary Lymphoid Tissues ». *Blood* 107 (3): 1048-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2452>.
- Loder, By Florienne, Bettina Mutschler, Robert J. Ray, Christopher J. Paige, Paschalis Sideras, Raul Torres, Marinus C. Lamers, et Rita Carsetti. 1999. « B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals ». *The Journal of Experimental Medicine* 190 (1): 75-90.
- Loiarro, Maria, Vito Ruggiero, et Claudio Sette. 2010. « Targeting TLR/IL-1R Signalling in Human Diseases ». *Mediators of Inflammation* 2010: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/674363>.
- Lomaga, Mark A., Wen-Chen Yeh, Ildiko Sarosi, Gordon S. Duncan, Caren Furlonger, Alexandra Ho, Sean Morony, et al. 1999. « TRAF6 Deficiency Results in Osteopetrosis and Defective Interleukin-1, CD40, and LPS Signaling ». *Genes & Development* 13 (8): 1015-24.
- Lord, K. A., B. Hoffman-Liebermann, et D. A. Liebermann. 1990. « Nucleotide Sequence and Expression of a cDNA Encoding MyD88, a Novel Myeloid Differentiation Primary Response Gene Induced by IL6 ». *Oncogene* 5 (7): 1095-97.
- Lu, Henry, Bradly Bauman, Swadhinya Arjunaraja, Batsukh Dorjbal, Joshua Milner, Andrew Snow, et Stuart Turvey. 2018. « The CBM-opathies—A Rapidly Expanding Spectrum of Human Inborn Errors of Immunity Caused by Mutations in the CARD11-BCL10-MALT1 Complex ». *Frontiers in Immunology* 9 (septembre): 2078. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02078>.
- Lu, Li, Fen Zhu, Meili Zhang, Yangguang Li, Amanda C. Drennan, Shuichi Kimpara, Ian Rumball, et al. 2018. « Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (3): E498-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715118115>.
- MacLennan, I. C., Y. J. Liu, S. Oldfield, J. Zhang, et P. J. Lane. 1990. « The Evolution of B-Cell Clones ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 159: 37-63. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75244-5_3.
- MacLennan, Ian C M. 1994. « Germinal Centers ».
- MacLennan, Ian C. M., Kai-Michael Toellner, Adam F. Cunningham, Karine Serre, Daniel M.-Y. Sze, Elina Zúñiga, Matthew C. Cook, et Carola G. Vinuesa. 2003. « Extrafollicular Antibody Responses: MacLennan et al · Extrafollicular Antibody Responses ». *Immunological Reviews* 194 (1): 8-18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00058.x>.
- MacLennan, I.C.M., D. Gray, D.S. Kumararatne, et H. Bazin. 1982. « The Lymphocytes of Splenic Marginal Zones: A Distinct B-Cell Lineage ». *Immunology Today* 3 (11): 305-7. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(82\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0167-5699(82)90032-9).

- Madrid, Lee V., Cun-Yu Wang, Denis C. Guttridge, Arndt J. G. Schottelius, Albert S. Baldwin, et Marty W. Mayo. 2000. « Akt Suppresses Apoptosis by Stimulating the Transactivation Potential of the RelA/P65 Subunit of NF- κ B ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (5): 1626-38. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1626-1638.2000>.
- Mahony, Christopher B., et Julien Y. Bertrand. 2019. « How HSCs Colonize and Expand in the Fetal Niche of the Vertebrate Embryo: An Evolutionary Perspective ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7 (mars). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00034>.
- Makris, Constantin, Virginia L Godfrey, Gertraud Krähn-Senftleben, Takayuki Takahashi, Jaclyn L Roberts, Thomas Schwarz, Lili Feng, Randall S Johnson, et Michael Karin. 2000. « Female Mice Heterozygous for IKK γ /NEMO Deficiencies Develop a Dermatopathy Similar to the Human X-Linked Disorder Incontinentia Pigmenti ». *Molecular Cell* 5 (6): 969-79. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80262-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80262-2).
- Massoumi, Ramin, Katarzyna Chmielarska, Katharina Hennecke, Alexander Pfeifer, et Reinhard Fässler. 2006. « Cxcl12 Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF- κ B Signaling ». *Cell* 125 (4): 665-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.041>.
- Mauri, Claudia, et Madhvi Menon. 2015. « The Expanding Family of Regulatory B Cells ». *International Immunology* 27 (10): 479-86. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv038>.
- Maurus, Katja, Silke Appenzeller, Sabine Roth, Jochen Kuper, Simone Rost, Svenja Meierjohann, Panagiota Arampatzi, et al. 2018. « Panel Sequencing Shows Recurrent Genetic FAS Alterations in Primary Cutaneous Marginal Zone Lymphoma ». *Journal of Investigative Dermatology* 138 (7): 1573-81. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.015>.
- McDonnell, T. J., et S. J. Korsmeyer. 1991. « Progression from Lymphoid Hyperplasia to High-Grade Malignant Lymphoma in Mice Transgenic for the t(14; 18) ». *Nature* 349 (6306): 254-56. <https://doi.org/10.1038/349254a0>.
- McDonnell, Timothy J., Natasha Deane, Frances M. Platt, Gabriel Nunez, Ulrich Jaeger, John P. McKearn, et Stanley J. Korsmeyer. 1989. « Bcl-2-Immunoglobulin Transgenic Mice Demonstrate Extended B Cell Survival and Follicular Lymphoproliferation ». *Cell* 57 (1): 79-88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90174-8).
- Meffre, Eric, Rafael Casellas, et Michel C. Nussenzweig. 2000. « Antibody Regulation of B Cell Development ». *Nature Immunology* 1 (5): 379-85. <https://doi.org/10.1038/80816>.
- Meffre, Eric, et Hedda Wardemann. 2008. « B-Cell Tolerance Checkpoints in Health and Autoimmunity ». *Current Opinion in Immunology, Autoimmunity / Allergy and Hypersensitivity*, 20 (6): 632-38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.09.001>.
- Melchers, Fritz. 2015. « Checkpoints That Control B Cell Development ». *Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2203-10. <https://doi.org/10.1172/JCI78083>.
- Melchers, Fritz, Tamotsu Yamagami, Antonius Rolink, et Jan Andersson. 2007. « Rules for the Rearrangement Events at the L Chain Gene Loci of the Mouse ». In *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation XI*, édité par Sudhir Gupta, Frederick Alt, Max Cooper, Fritz Melchers, et Klaus Rajewsky, 63-70. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-46530-8_6.
- Mémet, Sylvie, Dhafer Laouini, Jean-Charles Epinat, Simon T. Whiteside, Bertrand Goudeau, Dana Philpott, Samer Kayal, et al. 1999. « I κ B ϵ -Deficient Mice: Reduction of One T Cell Precursor Subspecies and Enhanced Ig Isotype Switching and Cytokine Synthesis ». *The Journal of Immunology* 163 (11): 5994-6005.

- Menter, Thomas, et Alexandar Tzankov. 2018. « Mechanisms of Immune Evasion and Immune Modulation by Lymphoma Cells ». *Frontiers in Oncology* 8: 54. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00054>.
- Mesin, Luka, Jonatan Ersching, et Gabriel D. Victora. 2016. « Germinal Center B Cell Dynamics ». *Immunity* 45 (3): 471-82. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>.
- Mikkola, Marja L., et Irma Thesleff. 2003. « Ectodysplasin Signaling in Development ». *Cytokine & Growth Factor Reviews, The TNF Superfamily*, 14 (3): 211-24. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00020-0).
- Milićević, Novica M., Karola Klaperski, Klaus Nohroudi, Živana Milićević, Katja Bieber, Babet Baraniec, Maike Blessenohl, Kathrin Kalies, Carl F. Ware, et Jürgen Westermann. 2011. « TNF Receptor-1 Is Required for the Formation of Splenic Compartments during Adult, but Not Embryonic Life ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (3): 1486-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000740>.
- Mitchell, Jennifer P., et Ruaidhrí J. Carmody. 2018. « Chapter Two - NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Friedemann Loos, 335:41-84. Transcriptional Gene Regulation in Health and Disease. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.007>.
- Moore, C. R., Y. Liu, C. Shao, L. R. Covey, H. C. Morse, et P. Xie. 2012. « Specific Deletion of TRAF3 in B Lymphocytes Leads to B-Lymphoma Development in Mice ». *Leukemia* 26 (5): 1122-27. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.309>.
- Moore, K. W., J. Rogers, T. Hunkapiller, P. Early, C. Nottenburg, I. Weissman, H. Bazin, R. Wall, et L. E. Hood. 1981. « Expression of IgD May Use Both DNA Rearrangement and RNA Splicing Mechanisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (3): 1800-1804. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.3.1800>.
- Morice, William G., Dong Chen, Paul J. Kurtin, Curtis A. Hanson, et Ellen D. McPhail. 2009. « Novel Immunophenotypic Features of Marrow Lymphoplasmacytic Lymphoma and Correlation with Waldenström's Macroglobulinemia ». *Modern Pathology* 22 (6): 807-16. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.34>.
- Mosse, Claudio, et Karen Weck. 2010. « The Molecular Pathology of Burkitt Lymphoma ». In *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*, édité par Cherie H. Dunphy, 4:277-85. Molecular Pathology Library. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5698-9_23.
- Mulero, Maria Carmen, Vivien Ya-Fan Wang, Tom Huxford, et Gourisankar Ghosh. 2019. « Genome reading by the NF- κ B transcription factors ». *Nucleic Acids Research* 47 (19): 9967-89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz739>.
- Müller-Schiffmann, Andreas, Benjamin Petsch, S. Rutger Leliveld, Janine Muyrers, Agnieska Salwierz, Christian Mangels, Stephan Schwarzinger, Detlev Riesner, Lothar Stitz, et Carsten Korth. 2009. « Complementarity Determining Regions of an Anti-Prion Protein ScFv Fragment Orchestrate Conformation Specificity and Antiprion Activity ». *Molecular Immunology* 46 (4): 532-40. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.023>.
- Nagamachi, Akiko, Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Yasuhiro Ebihara, Kohichiro Tsuji, Zen-ichiro Honda, et al. 2014. « Acquired Deficiency of A20 Results in Rapid Apoptosis, Systemic Inflammation, and Abnormal Hematopoietic Stem Cell Function ». *PLoS ONE* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087425>.

- Nagata, Kisaburo, Tetsuya Nakamura, Fujiko Kitamura, Satomi Kuramochi, Shinsuke Taki, Kerry S Campbell, et Hajime Karasuyama. 1997. « The Ig α /Ig β Heterodimer on α -Negative ProB Cells Is Competent for Transducing Signals to Induce Early B Cell Differentiation », 12.
- Nakagawa, Masahiro Marshall, et Chozha Vendan Rathinam. 2019. « A20 Deficiency in Hematopoietic Stem Cells Causes Lymphopenia and Myeloproliferation Due to Elevated Interferon- γ Signals ». *Scientific Reports* 9 (1): 12658. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49038-8>.
- Nakagawa, Masahiro Marshall, Keyur Thummar, Jonathan Mandelbaum, Laura Pasqualucci, et Chozha Vendan Rathinam. 2015. « Lack of the ubiquitin-editing enzyme A20 results in loss of hematopoietic stem cell quiescence ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (2): 203-16. <https://doi.org/10.1084/jem.20132544>.
- Nakano, H., S. Sakon, H. Koseki, T. Takemori, K. Tada, M. Matsumoto, E. Munechika, et al. 1999. « Targeted Disruption of Traf5 Gene Causes Defects in CD40- and CD27-Mediated Lymphocyte Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (17): 9803-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9803>.
- Naumann, M., A. Nieters, E. N. Hatada, et C. Scheidereit. 1993. « NF-Kappa B Precursor P100 Inhibits Nuclear Translocation and DNA Binding of NF-Kappa B/Rel-Factors ». *Oncogene* 8 (8): 2275-81.
- Nemazee, David. 2017. « Mechanisms of central tolerance for B cells ». *Nature reviews. Immunology* 17 (5): 281-94. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>.
- Ngo, Vu N., Ryan M. Young, Roland Schmitz, Sameer Jhavar, Wenming Xiao, Kian-Huat Lim, Holger Kohlhammer, et al. 2011. « Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma ». *Nature* 470 (7332): 115-19. <https://doi.org/10.1038/nature09671>.
- Nguyen, Linh T, Gordon S Duncan, Christine Mirtsos, Michelle Ng, Daniel E Speiser, Arda Shahinian, Michael W Marino, Tak W Mak, Pamela S Ohashi, et Wen-Chen Yeh. 1999. « TRAF2 Deficiency Results in Hyperactivity of Certain TNFR1 Signals and Impairment of CD40-Mediated Responses ». *Immunity* 11 (3): 379-89. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80113-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80113-2).
- Nguyen-Khac, Florence, Jerome Lambert, Elise Chapiro, Aurore Grelier, Sarah Mould, Carole Barin, Agnes Daudignon, et al. 2013. « Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia ». *Haematologica* 98 (4): 649-54. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.070458>.
- Nijland, Marieke L., Marie José Kersten, Steven T. Pals, Frederike J. Bemelman, et Ineke J.M. ten Berge. 2015. « Epstein-Barr Virus-Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management ». *Transplantation Direct* 2 (1). <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000557>.
- Nishizumi, Hirofumi, Ichiro Taniuchi, Yuji Yamanashi, Daisuke Kitamura, Dusko Ilic, Shigeo Mori, Takeshi Watanabe, et Tadashi Yamamoto. 1995. « Impaired Proliferation of Peripheral B Cells and Indication of Autoimmune Disease in Lyn-Deficient Mice ». *Immunity* 3 (5): 549-60. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90126-4](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90126-4).
- Nutt, S. L., P. Urbánek, A. Rolink, et M. Busslinger. 1997. « Essential Functions of Pax5 (BSAP) in pro-B Cell Development: Difference between Fetal and Adult B Lymphopoiesis and Reduced V-to-DJ Recombination at the IgH Locus. ». *Genes & Development* 11 (4): 476-91. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.476>.

- O'Connor, Brian P., Vanitha S. Raman, Loren D. Erickson, W. James Cook, Lehn K. Weaver, Cory Ahonen, Ling-Li Lin, George T. Mantchev, Richard J. Bram, et Randolph J. Noelle. 2004. « BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (1): 91-98. <https://doi.org/10.1084/jem.20031330>.
- Oeckinghaus, Andrea, et Sankar Ghosh. 2009. « The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>.
- Ong, S. Tiong, Marcy L. Hackbarth, Linda C. Degenstein, David A. Baunoch, John Anastasi, et Timothy W. McKeithan. 1998. « Lymphadenopathy, Splenomegaly, and Altered Immunoglobulin Production in BCL3 Transgenic Mice ». *Oncogene* 16 (18): 2333-43. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201771>.
- Ostuni, Renato, Ivan Zanoni, et Francesca Granucci. 2010. « Deciphering the Complexity of Toll-like Receptor Signaling ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (24): 4109-34. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0464-x>.
- Palanichamy, Arumugam, Jennifer Barnard, Bo Zheng, Teresa Owen, Tam Quach, Chungwen Wei, R. John Looney, Iñaki Sanz, et Jennifer H. Anolik. 2009. « Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (10): 5982-93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>.
- Pappu, Bhanu P., et Xin Lin. 2006. « Potential Role of CARMA1 in CD40-Induced Splenic B Cell Proliferation and Marginal Zone B Cell Maturation ». *European Journal of Immunology* 36 (11): 3033-43. <https://doi.org/10.1002/eji.200535663>.
- Pappu, Rajita, Alec M. Cheng, Bin Li, Qian Gong, Chris Chiu, Nancy Griffin, Mike White, Barry P. Sleckman, et Andrew C. Chan. 1999. « Requirement for B Cell Linker Protein (BLNK) in B Cell Development ». *Science* 286 (5446): 1949-54. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1949>.
- Parker, Mathew J., Steve Licence, Lena Erlandsson, Gunther R. Galler, Lyubomira Chakalova, Cameron S. Osborne, Geoff Morgan, et al. 2005. « The Pre-B-Cell Receptor Induces Silencing of VpreB and Lambda5 Transcription ». *The EMBO Journal* 24 (22): 3895-3905. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600850>.
- Parrens, M., N. Gachard, B. Petit, A. Marfak, E. Troadec, K. Bouabdalla, N. Milpied, et al. 2008. « Splenic Marginal Zone Lymphomas and Lymphoplasmacytic Lymphomas Originate from B-Cell Compartments with Two Different Antigen-Exposure Histories ». *Leukemia* 22 (8): 1621-24. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.24>.
- Pasparakis, Manolis, Marc Schmidt-Supprian, et Klaus Rajewsky. 2002. « I κ B Kinase Signaling Is Essential for Maintenance of Mature B Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (6): 743-52. <https://doi.org/10.1084/jem.20020907>.
- Pasqualucci, Laura. 2019. « Molecular Pathogenesis of Germinal Center-Derived B Cell Lymphomas ». *Immunological Reviews* 288 (1): 240-61. <https://doi.org/10.1111/imr.12745>.
- Pasqualucci, Laura, Oxana Bereschenko, Huifeng Niu, Ulf Klein, Katia Basso, Roberta Guglielmino, Giorgio Cattoretti, et Riccardo Dalla-Favera. 2003. « Molecular Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma: The Role of Bcl-6 ». *Leukemia & Lymphoma* 44 (sup3): S5-12. <https://doi.org/10.1080/10428190310001621588>.

- Pasqualucci, Laura, Hossein Khiabani, Marco Fangazio, Mansi Vasishtha, Monica Messina, Antony B. Holmes, Peter Ouillette, et al. 2014. « Genetics of follicular lymphoma transformation ». *Cell reports* 6 (1): 130-40. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.027>.
- Passegué, Emmanuelle, Catriona H. M. Jamieson, Laurie E. Ailles, et Irving L. Weissman. 2003. « Normal and Leukemic Hematopoiesis: Are Leukemias a Stem Cell Disorder or a Reacquisition of Stem Cell Characteristics? » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (suppl 1): 11842-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034201100>.
- Pedersen, Gabriel K., Monika Àdori, Sharesta Khoenkhoen, Pia Dosenovic, Bruce Beutler, et Gunilla B. Karlsson Hedestam. 2014. « B-1a transitional cells are phenotypically distinct and are lacking in mice deficient in κ BNS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (39): E4119-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415866111>.
- Pelanda, Roberta, Uschi Braun, Elias Hobeika, Michel C. Nussenzweig, et Michael Reth. 2002. « B Cell Progenitors Are Arrested in Maturation but Have Intact VDJ Recombination in the Absence of Ig- α and Ig- β ». *The Journal of Immunology* 169 (2): 865-72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.865>.
- Peltzer, Nieves, Maurice Darding, Antonella Montinaro, Peter Draber, Helena Draberova, Sebastian Kupka, Eva Rieser, et al. 2018. « LUBAC Is Essential for Embryogenesis by Preventing Cell Death and Enabling Haematopoiesis ». *Nature* 557 (7703): 112-17. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0064-8>.
- Peltzer, Nieves, Eva Rieser, Lucia Taraborrelli, Peter Draber, Maurice Darding, Barbara Pernaute, Yutaka Shimizu, et al. 2014. « HOIP Deficiency Causes Embryonic Lethality by Aberrant TNFR1-Mediated Endothelial Cell Death ». *Cell Reports* 9 (1): 153-65. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.066>.
- Pereira, Marta-Isabel, et José Augusto Medeiros. 2014. « Role of Helicobacter Pylori in Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (3): 684-98. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i3.684>.
- Perez, Jimena G., Nhan L. Tran, Michael G. Rosenblum, Craig S. Schneider, Nina P. Connolly, Anthony J. Kim, Graeme F. Woodworth, et Jeffrey A. Winkles. 2016. « The TWEAK Receptor Fn14 is a Potential Cell Surface Portal for Targeted Delivery of Glioblastoma Therapeutics ». *Oncogene* 35 (17): 2145-55. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.310>.
- Perez-Chacon, Gema, Magdalena Adrados, Maria T. Vallejo-Cremades, Sophie Lefebvre, John C. Reed, et Juan M. Zapata. 2019. « Dysregulated TRAF3 and BCL2 Expression Promotes Multiple Classes of Mature Non-Hodgkin B Cell Lymphoma in Mice ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03114>.
- Pérez-Chacón, Gema, David Llobet, Constanza Pardo, Jose Pindado, Yongwon Choi, John C. Reed, et Juan M. Zapata. 2012. « TRAF2 deficiency in B lymphocytes predisposes to chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in mice ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (2): 1053-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200814>.
- Pham-Ledard, Anne, Martina Prochazkova-Carlotti, Mélanie Deveza, Marie-Pierre Laforet, Marie Beylot-Barry, Béatrice Vergier, Marie Parrens, Jean Feuillard, Jean-Philippe Merlio, et Nathalie Gachard. 2017. « Molecular Analysis of Immunoglobulin Variable Genes Supports a Germinal Center Experienced Normal Counterpart in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type ». *Journal of Dermatological Science* 88 (2): 238-46. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.07.008>.

- Pieper, Kathrin, Bodo Grimbacher, et Hermann Eibel. 2013. « B-Cell Biology and Development ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (4): 959-71. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>.
- Plitas, George, et Alexander Y. Rudensky. 2016. « Regulatory T Cells: Differentiation and Function ». *Cancer immunology research* 4 (9): 721-25. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193>.
- Pobezinskaya, Yelena L., You-Sun Kim, Swati Choksi, Michael J. Morgan, Tao Li, Chengyu Liu, et Zhenggang Liu. 2008. « The function of TRADD in signaling via tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors ». *Nature immunology* 9 (9): 1047-54. <https://doi.org/10.1038/ni.1639>.
- Pohl, Thomas, Raffi Gugasyan, Raelene J. Grumont, Andreas Strasser, Donald Metcalf, David Tarlinton, William Sha, David Baltimore, et Steve Gerondakis. 2002. « The Combined Absence of NF-Kappa B1 and c-Rel Reveals That Overlapping Roles for These Transcription Factors in the B Cell Lineage Are Restricted to the Activation and Function of Mature Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4514-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.072071599>.
- Poulain, Stéphanie, Christophe Roumier, Audrey Decambron, Aline Renneville, Charles Herbaux, Elisabeth Bertrand, Sabine Tricot, et al. 2013. « MYD88 L265P Mutation in Waldenström Macroglobulinemia ». *Blood* 121 (22): 4504-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436329>.
- Poulain, Stéphanie, Christophe Roumier, Aurélie Venet-Caillault, Martin Figeac, Charles Herbaux, Guillemette Marot, Emmanuelle Doye, et al. 2016. « Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia ». *Clinical Cancer Research* 22 (6): 1480-88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0646>.
- Qiao, Qi, Chenghua Yang, Chao Zheng, Lorena Fontán, Liron David, Xiong Yu, Clay Bracken, et al. 2013. « Structural Architecture of the CARMA1/Bcl10/MALT1 Signalosome: Nucleation-Induced Filamentous Assembly ». *Molecular Cell* 51 (6): 766-79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.032>.
- Quezada, Sergio A., Lamis Z. Jarvinen, Evan F. Lind, et Randolph J. Noelle. 2004. « CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 22: 307-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104533>.
- Rao, Ping, Mathew S. Hayden, Meixiao Long, Martin L. Scott, A. Philip West, Dekai Zhang, Andrea Oeckinghaus, et al. 2010. « IκBβ acts to both inhibit and activate gene expression at different stages of the inflammatory response ». *Nature* 466 (7310): 1115-19. <https://doi.org/10.1038/nature09283>.
- Re, Alessandro, Chiara Cattaneo, et Giuseppe Rossi. 2019. « Hiv and Lymphoma: from Epidemiology to Clinical Management ». *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 11 (1). <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.004>.
- Reimann, Maurice, Jens F Schrezenmeier, Paulina Richter-Pechanska, Anna Dolnik, Timon Pablo Hick, Kolja Schleich, Xiurong Cai, et al. 2020. « Adaptive T-cell immunity controls senescence-prone MyD88- or CARD11-mutant B-cell lymphomas ». *Blood*, n° blood.2020005244 (novembre). <https://doi.org/10.1182/blood.2020005244>.
- Reth, M G, S Jackson, et F W Alt. 1986. « VHDJH formation and DJH replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. » *The EMBO Journal* 5 (9): 2131-38.

- Rice, N. R., M. L. MacKichan, et A. Israël. 1992. « The Precursor of NF- κ B P50 Has I κ B-like Functions ». *Cell* 71 (2): 243-53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90353-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90353-E).
- Rickert, Robert C., Julia Jellusova, et Ana V. Miletic. 2011. « Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease ». *Immunological reviews* 244 (1): 115-33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01067.x>.
- Rincón-Arévalo, Héctor, Claudia C. Sanchez-Parra, Diana Castaño, Lina Yassin, et Gloria Vásquez. 2016. « Regulatory B Cells and Mechanisms ». *International Reviews of Immunology* 35 (2): 156-76. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1015719>.
- Rizzo, Roberta, Valentina Audrito, Paola Vacca, Davide Rossi, Davide Brusa, Marina Stignani, Daria Bortolotti, et al. 2014. « HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism ». *Haematologica* 99 (5): 888-96. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095281>.
- Robaina, Mazzoccoli, et Esteves Klumb. 2019. « Germinal Centre B Cell Functions and Lymphomagenesis: Circuits Involving MYC and MicroRNAs ». *Cells* 8 (11): 1365. <https://doi.org/10.3390/cells8111365>.
- Roos-Weil, Damien, Brian Giacomelli, Marine Armand, Véronique Della-Valle, Hussein Ghamlouch, Camille Decaudin, Marlen Metzner, et al. 2020. « Identification of 2 DNA Methylation Subtypes of Waldenström Macroglobulinemia with Plasma and Memory B-Cell Features ». *Blood* 136 (5): 585-95. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005081>.
- Rosser, Elizabeth C., et Claudia Mauri. 2015. « Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function ». *Immunity* 42 (4): 607-12. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>.
- Rossi, Davide. 2014. « Role of MYD88 in Lymphoplasmacytic Lymphoma Diagnosis and Pathogenesis ». *Hematology* 2014 (1): 113-18. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.113>.
- Ru, Heng, Pengfei Zhang, et Hao Wu. 2018. « Structural gymnastics of RAG-mediated DNA cleavage in V(D)J recombination ». *Current opinion in structural biology* 53 (décembre): 178-86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.11.001>.
- Rudolph, Dorothea, Wen-Chen Yeh, Andrew Wakeham, Bettina Rudolph, Dhani Nallainathan, Julia Potter, Andrew J. Elia, et Tak W. Mak. 2000. « Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/I κ B-deficient mice ». *Genes & Development* 14 (7): 854-62.
- Ruland, Jürgen, Gordon S Duncan, Andrew Elia, Ivan del Barco Barrantes, Linh Nguyen, Sue Plyte, Douglas G Millar, et al. 2001. « Bcl10 Is a Positive Regulator of Antigen Receptor–Induced Activation of NF- κ B and Neural Tube Closure ». *Cell* 104 (1): 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00189-1).
- Ruland, Jürgen, Gordon S Duncan, Andrew Wakeham, et Tak W Mak. 2003. « Differential Requirement for Malt1 in T and B Cell Antigen Receptor Signaling ». *Immunity* 19 (5): 749-58. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00293-0).
- Säemann, M. D., P. Kelemen, M. Zeyda, G. Böhmig, G. Staffler, et G. J. Zlabinger. 2002. « CD40 Triggered Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Convert to Tolerogenic Dendritic Cells When JAK3 Activity Is Inhibited ». *Transplantation Proceedings* 34 (5): 1407-8. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(02\)02907-x](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(02)02907-x).
- Saito, Toshiki, Shigeru Chiba, Motoshi Ichikawa, Atsushi Kunisato, Takashi Asai, Kiyoshi Shimizu, Tomoyuki Yamaguchi, et al. 2003. « Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and

- Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development ». *Immunity* 18 (5): 675-85. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00111-0).
- Samardzic, Tatjana, Dragan Marinkovic, Claus-Peter Danzer, Judith Gerlach, Lars Nitschke, et Thomas Wirth. 2002. « Reduction of Marginal Zone B Cells in CD22-Deficient Mice ». *European Journal of Immunology* 32 (2): 561-67. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200202\)32:2<561::AID-IMMU561>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200202)32:2<561::AID-IMMU561>3.0.CO;2-H).
- Samson, Sandrine I., Sylvie Mémet, Christian A. J. Vosshenrich, Francesco Colucci, Odile Richard, Delphine Ndiaye, Alain Israël, et James P. Di Santo. 2004. « Combined Deficiency in I κ B α and I κ B ϵ Reveals a Critical Window of NF-KB Activity in Natural Killer Cell Differentiation ». *Blood* 103 (12): 4573-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2975>.
- Sanz, Ignacio, Chungwen Wei, Scott A. Jenks, Kevin S. Cashman, Christopher Tipton, Matthew C. Woodruff, Jennifer Hom, et F. Eun-Hyung Lee. 2019. « Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations ». *Frontiers in Immunology* 10 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>.
- Sarris, A. H., K. -O. Kliche, P. Pethambaram, A. Preti, S. Tucker, C. Jackow, O. Messina, et al. 1999. « Interleukin-10 Levels Are Often Elevated in Serum of Adults with Hodgkin's Disease and Are Associated with Inferior Failure-Free Survival ». *Annals of Oncology* 10 (4): 433-40. <https://doi.org/10.1023/A:1008301602785>.
- Sasaki, Yoshiteru, Dinis P. Calado, Emmanuel Derudder, Baochun Zhang, Yuri Shimizu, Fabienne Mackay, Shin-ichi Nishikawa, Klaus Rajewsky, et Marc Schmidt-Supprian. 2008. « NIK overexpression amplifies, whereas ablation of its TRAF3-binding domain replaces BAFF:BAFF-R-mediated survival signals in B cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10883-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805186105>.
- Sasaki, Yoshiteru, Stefano Casola, Jeffery L. Kutok, Klaus Rajewsky, et Marc Schmidt-Supprian. 2004. « TNF Family Member B Cell-Activating Factor (BAFF) Receptor-Dependent and -Independent Roles for BAFF in B Cell Physiology ». *The Journal of Immunology* 173 (4): 2245-52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2245>.
- Sasaki, Yoshiteru, Emmanuel Derudder, Elias Hobeika, Roberta Pelanda, Michael Reth, Klaus Rajewsky, et Marc Schmidt-Supprian. 2006. « Canonical NF-KappaB Activity, Dispensable for B Cell Development, Replaces BAFF-Receptor Signals and Promotes B Cell Proliferation upon Activation ». *Immunity* 24 (6): 729-39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.005>.
- Sato, Shinichi, Ann S. Miller, Makoto Inaoki, Cheryl B. Bock, Paul J. Jansen, Mimi L. K. Tang, et Thomas F. Tedder. 1996. « CD22 Is Both a Positive and Negative Regulator of B Lymphocyte Antigen Receptor Signal Transduction: Altered Signaling in CD22-Deficient Mice ». *Immunity* 5 (6): 551-62. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80270-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80270-8).
- Sato, Shuichi, Yuji Ogura, et Ashok Kumar. 2014. « TWEAK/Fn14 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Atrophy and Metabolic Dysfunction ». *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00018>.
- Schatz, David G., Marjorie A. Oettinger, et David Baltimore. 1989. « The V(D)J Recombination Activating Gene, RAG-1 ». *Cell* 59 (6): 1035-48. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90760-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90760-5).
- Scheibel, Melanie, Bettina Klein, Heidrun Merkle, Manon Schulz, Ralph Fritsch, Florian R. Greten, Melek C. Arkan, Günter Schneider, et Roland M. Schmid. 2010. « I κ B β is an essential co-activator for LPS-induced IL-1 β transcription in vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2621-30. <https://doi.org/10.1084/jem.20100864>.

- Schmitz, Roland, Michele Ceribelli, Stefania Pittaluga, George Wright, et Louis M. Staudt. 2014. « Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014282>.
- Schroeder, Harry W., et Lisa Cavacini. 2010. « Structure and Function of Immunoglobulins ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- Schuman, James, Yuhong Chen, Andrew Podd, Mei Yu, Hong-Hsing Liu, Renren Wen, Zhijian J. Chen, et Demin Wang. 2009. « A Critical Role of TAK1 in B-Cell Receptor–Mediated Nuclear Factor KB Activation ». *Blood* 113 (19): 4566-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-176057>.
- Schütz, Florian, Stefan Stefanovic, Luisa Mayer, Alexandra von Au, Christoph Domschke, et Christof Sohn. 2017. « PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer ». *Oncology Research and Treatment* 40 (5): 294-97. <https://doi.org/10.1159/000464353>.
- Schwarz, E. M., P. Krimpenfort, A. Berns, et I. M. Verma. 1997. « Immunological Defects in Mice with a Targeted Disruption in Bcl-3 ». *Genes & Development* 11 (2): 187-97. <https://doi.org/10.1101/gad.11.2.187>.
- Seifert, M, et R Küppers. 2016. « Human Memory B Cells ». *Leukemia* 30 (12): 2283-92. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.226>.
- Seifert, Marc, René Scholtysik, et Ralf Küppers. 2013. « Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas ». In *Lymphoma*, édité par Ralf Küppers, 971:1-25. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-269-8_1.
- Sen, Ranjan, et David Baltimore. 1986a. « Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences ». *Cell* 46 (5): 705-16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6).
- . 1986b. « Inducibility of κ Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF-KB by a Posttranslational Mechanism ». *Cell* 47 (6): 921-28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90807-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90807-X).
- Senarath, Kanishka, Dinesh Kankanamge, Saroopa Samaradivakara, Kasun Ratnayake, Mithila Tennakoon, et Ajith Karunarathne. 2018. « Chapter Five - Regulation of G Protein By Signaling ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Arun K. Shukla, 339:133-91. G Protein-Coupled Receptors: Emerging Paradigms in Activation, Signaling and Regulation Part B. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.02.008>.
- Senftleben, Uwe, Yixue Cao, Gutian Xiao, Florian R. Greten, Gertraud Krähn, Giuseppina Bonizzi, Yi Chen, et al. 2001. « Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF-KB Signaling Pathway ». *Science* 293 (5534): 1495-99. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>.
- Setz, Corinna S, Ahmad Khadour, Valerio Renna, Joseena Iype, Eva Gentner, Xiaocui He, Moumita Datta, et al. 2019. « Pten controls B-cell responsiveness and germinal center reaction by regulating the expression of IgD BCR ». *The EMBO Journal* 38 (11). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100249>.
- Sewastianik, Tomasz, Maria Luisa Guerrero, Keith Adler, Peter S. Dennis, Kyle Wright, Vignesh Shanmugam, Ying Huang, et al. 2019. « Human MYD88L265P Is Insufficient by Itself to Drive Neoplastic Transformation in Mature Mouse B Cells ». *Blood Advances* 3 (21): 3360-74. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000588>.
- Sha, William C, Hsiou-Chi Liou, Elaine I Tuomanen, et David Baltimore. 1995. « Targeted Disruption of the P50 Subunit of NF-KB Leads to Multifocal Defects in Immune Responses ». *Cell* 80 (2): 321-30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90415-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90415-8).

- Shah, Hemangi B., Kenneth Smith, Jonathan D. Wren, Carol F. Webb, Jimmy D. Ballard, Rebecka L. Bourn, Judith A. James, et Mark L. Lang. 2019. « Insights From Analysis of Human Antigen-Specific Memory B Cell Repertoires ». *Frontiers in Immunology* 9 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03064>.
- Shannon-Lowe, Claire, et Alan Rickinson. 2019. « The Global Landscape of EBV-Associated Tumors ». *Frontiers in Oncology* 9 (août). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00713>.
- Shapiro-Shelef, Miriam, et Kathryn Calame. 2005. « Regulation of plasma-cell development ». *Nature Reviews Immunology*, n° 3: 230.
- Shen, Yulei, Javeed Iqbal, James Z. Huang, Guimei Zhou, et Wing C. Chan. 2004. « BCL2 Protein Expression Parallels Its mRNA Level in Normal and Malignant B Cells ». *Blood* 104 (9): 2936-39. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0243>.
- Shi, Jian-Hong, et Shao-Cong Sun. 2018. « Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways ». *Frontiers in Immunology* 9 (août). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01849>.
- Shim, Jae-Hyuck, Changchun Xiao, Amber E. Paschal, Shannon T. Bailey, Ping Rao, Matthew S. Hayden, Ki-Young Lee, et al. 2005. « TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo ». *Genes & Development* 19 (22): 2668-81. <https://doi.org/10.1101/gad.1360605>.
- Shinkai, Yoichi, Gary Rathbun, Kong-Peng Lam, Eugene M. Oltz, Valerie Stewart, Monica Mendelsohn, Jean Charron, et al. 1992. « RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement ». *Cell* 68 (5): 855-67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-C).
- Shinners, Nicholas P., Gianluca Carlesso, Iris Castro, Kristen L. Hoek, Radiah A. Corn, Robert L. Woodland, Martin L. Scott, Demin Wang, et Wasif N. Khan. 2007. « Bruton's Tyrosine Kinase Mediates NF- κ B Activation and B Cell Survival by B Cell-Activating Factor Receptor of the TNF-R Family ». *The Journal of Immunology* 179 (6): 3872-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3872>.
- Shulga-Morskaya, Svetlana, Max Dobles, Meghan E. Walsh, Lai Guan Ng, Fabienne MacKay, Sambasiva P. Rao, Susan L. Kalled, et Martin L. Scott. 2004. « B Cell-Activating Factor Belonging to the TNF Family Acts through Separate Receptors to Support B Cell Survival and T Cell-Independent Antibody Formation ». *The Journal of Immunology* 173 (4): 2331-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2331>.
- Sitnicka, Ewa, Cord Brakebusch, Inga-Lill Martensson, Marcus Svensson, William W. Agace, Mikael Sigvardsson, Natalija Buza-Vidas, et al. 2003. « Complementary Signaling through flt3 and Interleukin-7 Receptor α Is Indispensable for Fetal and Adult B Cell Genesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (10): 1495-1506. <https://doi.org/10.1084/jem.20031152>.
- Slomp, Anne, et Victor Peperzak. 2018. « Role and Regulation of Pro-Survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma ». *Frontiers in Oncology* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00533>.
- Smith, Kenneth G.C., Amanda Light, Lorraine A. O'Reilly, Soon-Meng Ang, Andreas Strasser, et David Tarlinton. 2000. « bcl-2 Transgene Expression Inhibits Apoptosis in the Germinal Center and Reveals Differences in the Selection of Memory B Cells and Bone Marrow Antibody-Forming Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (3): 475-84.

- Snapper, C M, P Zelazowski, F R Rosas, M R Kehry, M Tian, D Baltimore, et W C Sha. 1996. « B Cells from P50/NF-Kappa B Knockout Mice Have Selective Defects in Proliferation, Differentiation, Germ-Line CH Transcription, and Ig Class Switching. », 10.
- Sokol, Caroline L., et Andrew D. Luster. 2015. « The Chemokine System in Innate Immunity ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (5): a016303. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>.
- Spina, Valeria, et Davide Rossi. 2016. « NF-KB Deregulation in Splenic Marginal Zone Lymphoma ». *Seminars in Cancer Biology* 39 (août): 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.08.002>.
- Stamper, Carin C., Yan Zhang, James F. Tobin, David V. Erbe, Shinji Ikemizu, Simon J. Davis, Mark L. Stahl, Jasbir Seehra, William S. Somers, et Lidia Mosyak. 2001. « Crystal Structure of the B7-1/CTLA-4 Complex That Inhibits Human Immune Responses ». *Nature* 410 (6828): 608-11. <https://doi.org/10.1038/35069118>.
- Stebegg, Marisa, Saumya D. Kumar, Alyssa Silva-Cayetano, Valter R. Fonseca, Michelle A. Linterman, et Luis Graca. 2018. « Regulation of the Germinal Center Response ». *Frontiers in Immunology* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>.
- Steidl, Christian, Sohrab P. Shah, Bruce W. Woolcock, Lixin Rui, Masahiro Kawahara, Pedro Farinha, Nathalie A. Johnson, et al. 2011. « MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers ». *Nature* 471 (7338): 377-81. <https://doi.org/10.1038/nature09754>.
- Stein, Alexander, Markus Moehler, Jörg Trojan, Eray Goekkurt, et Arndt Vogel. 2018. « Immuno-Oncology in GI Tumours: Clinical Evidence and Emerging Trials of PD-1/PD-L1 Antagonists ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 130 (octobre): 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.07.001>.
- Sue, Shih-Che, et H. Jane Dyson. 2009. « Interaction of the IkappaBalpha C-Terminal PEST Sequence with NF-KappaB: Insights into the Inhibition of NF-KappaB DNA Binding by IkappaBalpha ». *Journal of Molecular Biology* 388 (4): 824-38. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.048>.
- Sunil, Meena, Erin Reid, et Mary Jo Lechowicz. 2010. « Update on HHV-8-Associated Malignancies ». *Current Infectious Disease Reports* 12 (2): 147-54. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0092-5>.
- Suryani, Santi, David A. Fulcher, Brigitte Santner-Nanan, Ralph Nanan, Melanie Wong, Peter J. Shaw, John Gibson, Andrew Williams, et Stuart G. Tangye. 2010. « Differential Expression of CD21 Identifies Developmentally and Functionally Distinct Subsets of Human Transitional B Cells ». *Blood* 115 (3): 519-29. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234799>.
- Suzuki, Harumi, Yasuo Terauchi, Mari Fujiwara, Shinichi Aizawa, Yoshio Yazaki, Takashi Kadowaki, et Shigeo Koyasu. 1999. « Xid-Like Immunodeficiency in Mice with Disruption of the P85 α Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase ». *Science* 283 (5400): 390-92. <https://doi.org/10.1126/science.283.5400.390>.
- Suzuki, Nobutaka, Shinobu Suzuki, Gordon S. Duncan, Douglas G. Millar, Teiji Wada, Christine Mirtsos, Hidetoshi Takada, et al. 2002. « Severe Impairment of Interleukin-1 and Toll-like Receptor Signalling in Mice Lacking IRAK-4 ». *Nature* 416 (6882): 750-54. <https://doi.org/10.1038/nature736>.
- Swerdlow, Steven H., Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, et al. 2016. « The 2016 revision of the World Health Organization

- classification of lymphoid neoplasms ». *Blood* 127 (20): 2375-90.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.
- Szymanowska, Natalia, Wolfram Klapper, Stefan Gesk, Ralf Küppers, José I. Martín-Subero, et Reiner Siebert. 2008. « BCL2 and BCL3 Are Recurrent Translocation Partners of the IGH Locus ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 186 (2): 110-14.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.06.007>.
- Taga, Hiromi, Kazuyuki Taga, Frederick Wang, Jane Chretien, et Giovanna Tosato. 1995. « Human and Viral Interleukin-10 in Acute Epstein-Barr Virus-Induced Infectious Mononucleosis ». *The Journal of Infectious Diseases* 171 (5): 1347-50. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.5.1347>.
- Takeda, Kiyoshi, Osamu Takeuchi, Tooru Tsujimura, Satoshi Itami, Osamu Adachi, Taro Kawai, Hideki Sanjo, Kunihiko Yoshikawa, Nobuyuki Terada, et Shizuo Akira. 1999. « Limb and Skin Abnormalities in Mice Lacking IKK α ». *Science* 284 (5412): 313-16.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5412.313>.
- Tang, Xiaoyu, Lingling Zhang, et Wei Wei. 2018. « Roles of TRAFs in NF-KB Signaling Pathways Mediated by BAFF ». *Immunology Letters* 196 (avril): 113-18.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.010>.
- Tavares, Rita M., Emre E. Turer, Chih L. Liu, Rommel Advincula, Patrizia Scapini, Lesley Rhee, Julio Barrera, et al. 2010. « The Ubiquitin Modifying Enzyme A20 Restricts B cell Survival and Prevents Autoimmunity ». *Immunity* 33 (2): 181-91.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.017>.
- Tkachuk, Maria, Stephan Bolliger, Bernhard Ryffel, Gerd Pluschke, Theresa A. Banks, Suzanne Herren, Roland H. Gisler, et Marie H. Kosco-Vilbois. 1998. « Crucial Role of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Expression on Nonhematopoietic Cells for B Cell Localization within the Splenic White Pulp ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (4): 469-77.
- Tobón, Gabriel J., Jorge H. Izquierdo, et Carlos A. Cañas. 2013. « B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus ». *Autoimmune Diseases* 2013: 1-17. <https://doi.org/10.1155/2013/827254>.
- Tokoyoda, Koji, Takeshi Egawa, Tatsuki Sugiyama, Byung-Il Choi, et Takashi Nagasawa. 2004. « Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development ». *Immunity* 20 (6): 707-18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.001>.
- Tompkins, V S, R Sompallae, T R Rosean, S Walsh, M Acevedo, A L Kovalchuk, S-S Han, et al. 2016. « Transgenic mouse model of IgM+ lymphoproliferative disease mimicking Waldenström macroglobulinemia ». *Blood Cancer Journal* 6 (11): e488.
<https://doi.org/10.1038/bcj.2016.95>.
- Tonegawa, S. 1983. « Somatic Generation of Antibody Diversity ». *Nature* 302 (5909): 575-81.
<https://doi.org/10.1038/302575a0>.
- Tonoyan, Lilit, Séverine Vincent, Charles-Vivien Olivieri, et Alain Doglio. 2019. « New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (novembre): 5861. <https://doi.org/10.3390/ijms20235861>.
- Touma, Maki, Derin B. Keskin, Fumiko Shiroki, Ibuki Saito, Shigeo Koyasu, Ellis L. Reinherz, et Linda K. Clayton. 2011. « Impaired B Cell Development and Function in the Absence of I κ BNS ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (8): 3942-52.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002109>.

- Treon, Steven P., Lian Xu, Guang Yang, Yangsheng Zhou, Xia Liu, Yang Cao, Patricia Sheehy, et al. 2012. « MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia ». *New England Journal of Medicine* 367 (9): 826-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200710>.
- Tsitsikov, Erdyni N, Dhafer Laouini, Ian F Dunn, Tatyana Y Sannikova, Laurie Davidson, Frederick W Alt, et Raif S Geha. 2001. « TRAF1 Is a Negative Regulator of TNF Signaling: Enhanced TNF Signaling in TRAF1-Deficient Mice ». *Immunity* 15 (4): 647-57. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00207-2).
- Turer, Emre E., Rita M. Tavares, Erwan Mortier, Osamu Hitotsumatsu, Rommel Advincula, Bettina Lee, Nataliya Shifrin, Barbara A. Malynn, et Averil Ma. 2008. « Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20 ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (2): 451-64. <https://doi.org/10.1084/jem.20071108>.
- Übelhart, Rudolf, et Hassan Jumaa. 2015. « Autoreactivity and the Positive Selection of B Cells ». *European Journal of Immunology* 45 (11): 2971-77. <https://doi.org/10.1002/eji.201444622>.
- Ullah, M. Obayed, Matthew J. Sweet, Ashley Mansell, Stuart Kellie, et Bostjan Kobe. 2016. « TRIF-Dependent TLR Signaling, Its Functions in Host Defense and Inflammation, and Its Potential as a Therapeutic Target ». *Journal of Leukocyte Biology* 100 (1): 27-45. <https://doi.org/10.1189/jlb.2R11115-531R>.
- Venturutti, Leandro, et Ari M. Melnick. 2020. « The Dangers of Déjà vu: Memory B Cells as the Cells of Origin of ABC-DLBCLs ». *Blood* 136 (20): 2263-74. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005857>.
- Vettermann, Christian, et Mark S. Schlissel. 2010. « Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms ». *Immunological reviews* 237 (1): 22-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x>.
- Viatour, Patrick, Marie-Paule Merville, Vincent Bours, et Alain Chariot. 2005. « Phosphorylation of NF-κB and IκB Proteins: Implications in Cancer and Inflammation ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (1): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.11.009>.
- Vincent-Fabert, Christelle, Lilian Roland, Ursula Zimmer-Strobl, Jean Feuillard, et Nathalie Faumont. 2019. « Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF-κB, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma ». *Cell Communication and Signaling* 17 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0391-x>.
- Violeta Filip, Petruta, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Department of Internal Medicine II and Gastroenterology, Emergency University Hospital, Bucharest, Denisa Cuciureanu, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Laura Sorina Diaconu, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, et al. 2018. « MALT Lymphoma: Epidemiology, Clinical Diagnosis and Treatment ». *Journal of Medicine and Life* 11 (3): 187-93. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0035>.
- Vossenkämper, Anna, et Jo Spencer. 2011. « Transitional B Cells: How Well Are the Checkpoints for Specificity Understood? ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59 (5): 379-84. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0135-0>.
- Walker, Brian A., Konstantinos Mavrommatis, Christopher P. Wardell, T. Cody Ashby, Michael Bauer, Faith E. Davies, Adam Rosenthal, et al. 2018. « Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma ». *Blood* 132 (6): 587-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-840132>.

- Wang, Chen, Li Deng, Mei Hong, Giridhar R. Akkaraju, Jun-ichiro Inoue, et Zhijian J. Chen. 2001. « TAK1 Is a Ubiquitin-Dependent Kinase of MKK and IKK ». *Nature* 412 (6844): 346-51. <https://doi.org/10.1038/35085597>.
- Wang, Demin, Jian Feng, Renren Wen, Jean-Christophe Marine, Mark Y. Sangster, Evan Parganas, Angelika Hoffmeyer, et al. 2000. « Phospholipase C γ 2 Is Essential in the Functions of B Cell and Several Fc Receptors ». *Immunity* 13 (1): 25-35. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00005-4).
- Wang, James Q., Yogesh S. Jeelall, Laura L. Ferguson, et Keisuke Horikawa. 2014. « Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00367>.
- Wang, Liang Wei, Sizun Jiang, et Benjamin E. Gewurz. 2017. « Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Oncogenicity ». Édité par Michaela Ulrike Gack. *Journal of Virology* 91 (21): e01718-16, e01718-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01718-16>.
- Wang, Wei, et Pei Lin. 2020. « Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldenström Macroglobulinaemia: Clinicopathological Features and Differential Diagnosis ». *Pathology* 52 (1): 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.009>.
- Wang, Yui-Hsi, Jun Nomura, Ona Marie Faye-Petersen, et D Cooper. 1998. « Surrogate Light Chain Production During B Cell Differentiation: Differential Intracellular Versus Cell Surface Expression ». *The Journal of Immunology*, 9.
- Wardemann, Hedda, et Michel C. Nussenzweig. 2007. « B-Cell Self-Tolerance in Humans ». In *Advances in Immunology*, 95:83-110. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)95003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)95003-8).
- Weih, Debra S., Z. Buket Yilmaz, et Falk Weih. 2001. « Essential Role of RelB in Germinal Center and Marginal Zone Formation and Proper Expression of Homing Chemokines ». *The Journal of Immunology* 167 (4): 1909-19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1909>.
- Weih, F., S. K. Durham, D. S. Barton, W. C. Sha, D. Baltimore, et R. Bravo. 1997. « P50-NF-KappaB Complexes Partially Compensate for the Absence of RelB: Severely Increased Pathology in P50(-/-)RelB(-/-) Double-Knockout Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 185 (7): 1359-70. <https://doi.org/10.1084/jem.185.7.1359>.
- Weih, Falk, et Jorge Caamaño. 2003. « Regulation of Secondary Lymphoid Organ Development by the Nuclear Factor-KappaB Signal Transduction Pathway ». *Immunological Reviews* 195 (octobre): 91-105. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00064.x>.
- Weill, Jean-Claude, Sandra Weller, et Claude-Agnès Reynaud. 2009. « Human Marginal Zone B Cells ». *Annual Review of Immunology* 27 (1): 267-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>.
- Weiss, Arthur, et Dan R. Littman. 1994. « Signal Transduction by Lymphocyte Antigen Receptors ». *Cell* 76 (2): 263-74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90334-4).
- Wertz, I. E., et V. M. Dixit. 2010. « Signaling to NF- κ B: Regulation by Ubiquitination ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): a003350-a003350. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003350>.
- Wessells, Jennifer, Mark Baer, Howard A. Young, Estefania Claudio, Keith Brown, Ulrich Siebenlist, et Peter F. Johnson. 2004. « BCL-3 and NF- κ B P50 Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 49995-3. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404246200>.

- Weyden, C. A. van der, S. A. Pileri, A. L. Feldman, J. Whisstock, et H. M. Prince. 2017. « Understanding CD30 Biology and Therapeutic Targeting: A Historical Perspective Providing Insight into Future Directions ». *Blood Cancer Journal* 7 (9): e603-e603. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.85>.
- Williams, Hilary, et Dorothy H. Crawford. 2006. « Epstein-Barr Virus: The Impact of Scientific Advances on Clinical Practice ». *Blood* 107 (3): 862-69. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2702>.
- Wilson, Anne, et Andreas Trumpp. 2006. « Bone-Marrow Haematopoietic-Stem-Cell Niches ». *Nature Reviews Immunology* 6 (2): 93-106. <https://doi.org/10.1038/nri1779>.
- Winkler, Thomas H., et Inga-Lill Mårtensson. 2018. « The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance ». *Frontiers in Immunology* 9 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02423>.
- Woyach, Jennifer A., Amy J. Johnson, et John C. Byrd. 2012. « The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL ». *Blood* 120 (6): 1175-84. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-362624>.
- Xia, Zong-Ping, Lijun Sun, Xiang Chen, Gabriel Pineda, Xiaomo Jiang, Anirban Adhikari, Wenwen Zeng, et Zhijian J. Chen. 2009. « Direct Activation of Protein Kinases by Unanchored Polyubiquitin Chains ». *Nature* 461 (7260): 114-19. <https://doi.org/10.1038/nature08247>.
- Xiao, Gutian, Abraham Fong, et Shao-Cong Sun. 2004. « Induction of P100 Processing by NF-KappaB-Inducing Kinase Involves Docking IkappaB Kinase Alpha (IKKalpha) to P100 and IKKalpha-Mediated Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (29): 30099-105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401428200>.
- Xie, Ping, Laura L. Stunz, Karen D. Larison, Baoli Yang, et Gail A. Bishop. 2007. « TRAF3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs ». *Immunity* 27 (2): 253-67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.012>.
- Xing, Wei, Karen Dresser, Rui Zhang, Andrew M. Evens, Hongbo Yu, Bruce A. Woda, et Benjamin J. Chen. 2016. « PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications ». *Oncotarget* 7 (37): 59976-86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11045>.
- Xiong, Lili, Wei Jiang, Rui Zhou, Canquan Mao, et Zhiyun Guo. 2013. « Identification and Analysis of the Regulatory Network of Myc and MicroRNAs from High-Throughput Experimental Data ». *Computers in Biology and Medicine* 43 (9): 1252-60. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2013.06.002>.
- Xu, Shengli, et Kong-Peng Lam. 2001. « B-Cell Maturation Protein, Which Binds the Tumor Necrosis Factor Family Members BAFF and APRIL, Is Dispensable for Humoral Immune Responses ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (12): 4067-74. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.12.4067-4074.2001>.
- Xu, Y., G. Cheng, et D. Baltimore. 1996. « Targeted Disruption of TRAF3 Leads to Postnatal Lethality and Defective T-Dependent Immune Responses ». *Immunity* 5 (5): 407-15. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80497-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80497-5).
- Xue, Liquan, Stephan W. Morris, Carlos Orihuela, Elaine Tuomanen, Xiaoli Cui, Renren Wen, et Demin Wang. 2003. « Defective Development and Function of Bcl10-Deficient Follicular, Marginal Zone and B1 B Cells ». *Nature Immunology* 4 (9): 857-65. <https://doi.org/10.1038/ni963>.

- Xu-Monette, Zijun Y., Jianfeng Zhou, et Ken H. Young. 2018. « PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas ». *Blood* 131 (1): 68-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-740993>.
- Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Hideki Sanjo, Osamu Takeuchi, et al. 2003. « Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633): 640-43. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>.
- Yamamoto, Masahiro, Soh Yamazaki, Satoshi Uematsu, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, et al. 2004. « Regulation of Toll/IL-1-Receptor-Mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein I κ B ζ ». *Nature* 430 (6996): 218-22. <https://doi.org/10.1038/nature02738>.
- Yamaoka, Shoji, Gilles Courtois, Christine Bessia, Simon T Whiteside, Robert Weil, Fabrice Agou, Heather E Kirk, Robert J Kay, et Alain Israël. 1998. « Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I κ B Kinase Complex Essential for NF- κ B Activation ». *Cell* 93 (7): 1231-40. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81466-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81466-X).
- Yamazaki, Soh, Tatsushi Muta, Susumu Matsuo, et Koichiro Takeshige. 2005. « Stimulus-Specific Induction of a Novel Nuclear Factor- κ B Regulator, I κ B- ζ , via Toll/Interleukin-1 Receptor Is Mediated by mRNA Stabilization ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 1678-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409983200>.
- Yang, Guang, Sara J. Buhrlage, Li Tan, Xia Liu, Jie Chen, Lian Xu, Nicholas Tsakmaklis, et al. 2016. « HCK Is a Survival Determinant Transactivated by Mutated MYD88, and a Direct Target of Ibrutinib ». *Blood* 127 (25): 3237-52. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-695098>.
- Yang, Guang, Yangsheng Zhou, Xia Liu, Lian Xu, Yang Cao, Robert J. Manning, Christopher J. Patterson, et al. 2013. « A Mutation in MYD88 (L265P) Supports the Survival of Lymphoplasmacytic Cells by Activation of Bruton Tyrosine Kinase in Waldenström Macroglobulinemia ». *Blood* 122 (7): 1222-32. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475111>.
- Yang, Yibin, Roland Schmitz, Joseph Mitala, Amanda Whiting, Wenming Xiao, Michele Ceribelli, George W. Wright, et al. 2014. « Essential Role of the Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex in Lymphoma Revealed by Rare Germline Polymorphisms ». *Cancer Discovery* 4 (4): 480-93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0915>.
- Yeh, Wen-Chen, Arda Shahinian, Daniel Speiser, Janine Kraunus, Filio Billia, Andrew Wakeham, José Luis de la Pompa, et al. 1997. « Early Lethality, Functional NF- κ B Activation, and Increased Sensitivity to TNF-Induced Cell Death in TRAF2-Deficient Mice ». *Immunity* 7 (5): 715-25. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80391-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80391-X).
- Yin, Li, Lin Wu, Holger Wesche, Cora D. Arthur, J. Michael White, David V. Goeddel, et Robert D. Schreiber. 2001. « Defective Lymphotoxin- β Receptor-Induced NF- κ B Transcriptional Activity in NIK-Deficient Mice ». *Science* 291 (5511): 2162-65. <https://doi.org/10.1126/science.1058453>.
- Yu, Hui, Theresa A. Boyle, Caicun Zhou, David L. Rimm, et Fred R. Hirsch. 2016. « PD-L1 Expression in Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (7): 964-75. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.04.014>.
- Yu, Vionnie W.C., et David T. Scadden. 2016. « Heterogeneity of the Bone Marrow Niche ». *Current Opinion in Hematology* 23 (4): 331-38. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000265>.

- Yu, Xinfang, Wei Li, Qipan Deng, Ling Li, Eric D. Hsi, Ken H. Young, Mingzhi Zhang, et Yong Li. 2018. « MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies ». *Cancer Research* 78 (10): 2457-62. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0215>.
- Zapata, Juan M., David Llobet, Maryla Krajewska, Sophie Lefebvre, Christina L. Kress, et John C. Reed. 2009. « Lymphocyte-Specific TRAF3 Transgenic Mice Have Enhanced Humoral Responses and Develop Plasmacytosis, Autoimmunity, Inflammation, and Cancer ». *Blood* 113 (19): 4595-4603. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-165456>.
- Zhang, Baochun, Dinis Pedro Calado, Zhe Wang, Sebastian Fröhler, Karl Köchert, Yu Qian, Sergei B. Koralov, et al. 2015. « An Oncogenic Role for Alternative NF- κ B Signaling in DLBCL, Revealed Upon Deregulated BCL6 Expression ». *Cell reports* 11 (5): 715-26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.059>.
- Zhang, Hua, Yan Li, Hong-Bo Wang, Ao Zhang, Mei-Ling Chen, Zhi-Xin Fang, Xiao-Dong Dong, et al. 2018. « Ephrin Receptor A2 Is an Epithelial Cell Receptor for Epstein–Barr Virus Entry ». *Nature Microbiology* 3 (2): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0080-8>.
- Zhang, Jiyuan, David Dominguez-Sola, Shafinaz Hussein, Ji-Eun Lee, Antony B. Holmes, Mukesh Bansal, Sofija Vlasevska, et al. 2015. « Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis ». *Nature medicine* 21 (10): 1190-98. <https://doi.org/10.1038/nm.3940>.
- Zhang, Qian, Michael J. Lenardo, et David Baltimore. 2017. « 30 Years of NF-KB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology ». *Cell* 168 (1): 37-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>.
- Zhang, Yang, Laura Garcia-Ibanez, et Kai-Michael Toellner. 2016. « Regulation of Germinal Center B-Cell Differentiation ». *Immunological Reviews* 270 (1): 8-19. <https://doi.org/10.1111/imr.12396>.
- Zhou, Q., J. Yan, P. Putheti, Y. Wu, X. Sun, V. Toxavidis, J. Tigges, et al. 2009. « Isolated CD39 Expression on CD4+ T Cells Denotes both Regulatory and Memory Populations ». *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (10): 2303-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02777.x>.
- Zucca, Emanuele, et Francesco Bertoni. 2016. « The Spectrum of MALT Lymphoma at Different Sites: Biological and Therapeutic Relevance ». *Blood* 127 (17): 2082-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-624304>.

Résumé

Les lymphomes ont causé 557 730 décès dans le monde en 2018 et sont la 5ème cause de mortalité due à un cancer en France. Les recherches fondamentales et appliquées dans ce domaine sont donc cruciales pour améliorer les diagnostics et les thérapies. Les voies de signalisation cellulaire du facteur de transcription NF- κ B, jouant un rôle central dans la survie et la prolifération de la cellule, sont fréquemment dérégulées et impliquées dans l'émergence des lymphomes non Hodgkinien des cellules B (LNHB). Les études menées au laboratoire sur ces trois années concernaient le rôle de MYD88 et de NF- κ B dans le contexte de l'émergence des lymphomes liés à la cellule B. La mutation L265P de la protéine adaptatrice MYD88 (MYD88^{L265P}), exacerbant la signalisation des « toll like receptor » (TLR), récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée de la cellule B entraîne une activation constitutive de NF- κ B. La protéine mutée MYD88^{L265P} est retrouvée dans de nombreux cas de LNHB allant des lymphomes lymphoplasmocytaires (LLP) indolents aux lymphomes agressifs diffus à grandes cellules B (DLBCL). La macroglobulinémie de Waldenström (MW) présente dans environ 90% des cas, cette mutation MYD88^{L265P}, faisant d'elle un évènement primaire dans l'émergence de ce LLP. Pour pouvoir étudier les conséquences d'une telle mutation sur la transformation de la cellule B, nous avons réalisé une étude *in vivo*, via un modèle murin exprimant MYD88^{L252P} (orthologue murin de la mutation MYD88^{L265P} chez l'humain) seulement dans les cellules B grâce à l'expression de la CRE-recombinase via le promoteur du gène *Cd19*. En effet, l'étude de ce modèle développant un lymphome présentant des similarités avec la MW, nous a permis de visualiser son pouvoir transformant sur la cellule B, mais aussi le comportement de la cellule dans le microenvironnement d'un organisme entier. Nous avons pu confirmer l'aptitude de MYD88^{L252P} à former un clone lymphoplasmocyttaire, ainsi que la présence d'un pic d'IgM monoclonal dans le sérum et une invasion de plasmocytes à IgM dans la moelle osseuse, qui sont des caractéristiques de la MW.

L'échappement immunitaire est une composante majeure dans l'émergence des LNHB. Dans le cas des lymphomes liés au virus d'Epstein Barr (EBV), les cellules B immortalisées par ce virus sont aussi aptes à moduler la réponse immunitaire qui leur est adressée. Concernant ce dernier phénomène, nous avons décrit le profil immunorégulateur *in vitro* de cellules B infectées par l'EBV en latence III. La protéine LMP1, produite lors de la latence II et III, active essentiellement la voie canonique de NF- κ B, et permet la surexpression des protéines immunomodulatrice PD-L1, IL-10, TGF- β 1 et IL35 (EBI3 et IL12A). Nous avons aussi mis en évidence, l'expansion des cellules T régulatrices (Treg) conventionnelles et non conventionnelles dépendant de l'axe PD-1/PD-L1. Dans de nombreux cancers, la protéine de surface PD-L1 est surexprimée impactant fortement le microenvironnement des cellules tumorales. Ainsi, dans le cas des DLBCL, cette surexpression est associée à un mauvais pronostic. Du fait de son importance dans la progression de la tumeur, les tests thérapeutiques avec des anticorps anti-PD-L1 peuvent se révéler être très efficaces. Pour cela, nous avons réalisé des tests précliniques *in vivo* ciblant PD-L1 directement, et *ex vivo* ciblant les voies permettant son expression dans le modèle murin L.CD40 (*Imp1/cd40*) développant un lymphome indolent se rapprochant du lymphome de la zone marginale (LZM) dans lequel nous avons montré que les tumeurs B surexprimaient la protéine PD-L1. Nous avons pu démontrer les effets bénéfiques de ce traitement avec une réduction de la taille de la rate *in vivo*, une diminution de l'expression du gène *PD-L1* *ex vivo* et une réactivation des cellules T. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives de recherche sur l'échappement à la réponse immunitaire dans les LNHB associés à la mutation activatrice de MYD88.

Mots clés : LNHB, MYD88, NF- κ B, EBV, immunomodulation

Abstract

It was estimated that 557 730 deaths from lymphoma worldwide in 2018 and are the 5th leading cause of cancer death in France. Basic and applied research in this area is therefore crucial to improve diagnostics and therapies. Cell signaling pathways of the transcription factor NF- κ B, playing a central role in cell survival and proliferation, are frequently deregulated and involved in the emergence of non-Hodgkin B-cell lymphomas (B-NHL). The laboratory studies over these three years concerned the role of MYD88 and NF- κ B in the context of the emergence of B cell-linked lymphomas. The L265P mutation of protein adaptor MYD88 (MYD88^{L265P}), exacerbating toll-like receptor (TLR) signaling, receptors involved in the innate immune B cell response, results in constitutive NF- κ B activation. This mutated protein MYD88^{L265P} is found in many cases of LNH ranging from indolent lymphoplasmacytic lymphomas (LPL) to aggressive diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL). Waldenström's macroglobulinemia (WM) presents in about 90% of cases this MYD88^{L265P} mutation, making it a primary event in the emergence of this LPL. To study the consequences of this mutation on the transformation of the B cell, we carried out a *in vivo* study, thanks to a murine model expressing MYD88^{L252P} (murine ortholog of the MYD88^{L265P} mutation in humans) exclusively in B cells through the expression of CRE-recombinase due to the *Cd19* promoter. Indeed, the study of this model developing a lymphoma close to WM, allowed us to visualize its transforming power on the B cell, but also the behavior of the cell in the microenvironment of an entire organism. We were able to confirm the ability of MYD88^{L252P} to form a lymphoplasmacytic clone, as well as the presence of a serum monoclonal IgM peak and an IgM plasma cells invasion in the bone marrow, which are characteristics of WM.

Immune escape is a major component in the emergence of B-LNH. In the case of lymphomas linked to the Epstein Barr virus (EBV), the B cells immortalized by this virus are also able to modulate the immune response. Regarding this last phenomenon, we have described the immunoregulatory profile *in vitro* of B cells infected by EBV in latency III. The LMP1 protein, produced during latency II and III, essentially activating the NF- κ B alternative pathway, allows the overexpression of the immunomodulatory proteins PD-L1, IL-10, TGF- β 1 and IL35 (EBI3 and IL12A). We have also demonstrated the expansion of conventional and unconventional regulatory T cells (Tregs) depending on the PD-1/PD-L1 axis. In many cancers, the PD-L1 surface protein is overexpressed, strongly impacting the microenvironment of tumor cells. Thus, in the case of DLBCL, this overexpression associated to poor prognosis. Due to its importance in the progression of the tumor, therapeutic tests with anti-PD-L1 antibodies can be very effective. For this, we did preclinical *in vivo* tests targeting PD-L1 directly, and *ex vivo* targeting the pathways allowing its expression. The L.CD40 (*Imp1/cd40*) murine model developing indolent lymphoma close to marginal zone lymphoma (MZL), in which we shown the overexpression of PD-L1 from tumoral B cells. We were able to demonstrate the beneficial effects of this treatment with a *in vivo* spleen size reduction and *ex vivo* PD-L1 downregulation, as well as T cell reactivation. These studies open new research perspectives on our MYD88 mouse model.

Keywords: NHBL, MYD88, NF- κ B, EBV, immunomodulation