



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes moléculaires induits par l'activation de la voie de signalisation NOTCH2 dans les lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL)

Mylène Bun

► **To cite this version:**

Mylène Bun. Etude des mécanismes moléculaires induits par l'activation de la voie de signalisation NOTCH2 dans les lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL). Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL067 . tel-04036129

**HAL Id: tel-04036129**

**<https://theses.hal.science/tel-04036129>**

Submitted on 19 Mar 2023

**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.

# Etude des mécanismes moléculaires induits par l'activation de la voie de signalisation NOTCH2 dans les lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL)

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°582 : cancérologie – biologie – médecine – santé (CBMS)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Institut Gustave Roussy, Dynamique moléculaire de  
la transformation hématopoïétique, 94805 Villejuif, France.

Référent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Paris, le 18 décembre 2020, par**

**Mylène BUN**

## Composition du Jury

**Thomas MERCHER**

DR, Université Paris-Saclay

Président

**Emmanuelle CLAPPIER**

MCU, Université Paris-Diderot

Rapporteuse

**Ludovic DERIANO**

DR, Institut Pasteur

Rapporteur

**Dominique BLUTEAU**

MCU, EPHE

Examinatrice

**Raphaël ITZYKSON**

PUPH, Université Paris-Diderot

Examineur

**Olivier KOSMIDER**

PUPH, Institut Cochin

Examineur

**Camille LOBRY**

DR, Institut de Recherche Saint-Louis

Directeur de thèse

# Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Camille Lobry.

Je tiens à remercier les membres de mon jury : Dr. Emmanuelle Clappier, Dr. Ludovic Deriano, Dr. Thomas Mercher, Dr. Dominique Bluteau, Dr. Raphaël Itzykson et le Dr. Olivier Kosmider d'avoir accepté de juger ma thèse qui sera soutenue le 18 décembre 2020.

Je tiens à remercier les anciens membres de mon laboratoire de recherche pour avoir fait le crible d'ARN interférents.

Je tiens à remercier Jiang et Séverine, membre actuels du laboratoire.

Je souhaiterais remercier le nouveau Padawan de Camille, Yannis Belloucif. Je te lègue le flambeau, ne me déçois pas. Beaucoup de rigolades ensemble ! Bon courage !

Je tiens à remercier quelques membres du laboratoire du Dr. Puissant de m'avoir bien intégrée à l'institut de recherche St Louis et pour le Monday Cake Day !

Je tiens remercier ceux qui ont contribué à rendre cette thèse, une aventure qui vaut la peine d'être vécue : ma famille, mon fiancé et mes amis(es).

Rebecca Faura, Chris Laguerre, Novin (aka NoNo) Beerunj, Souss, Diane Kam, Kevin Lim, Emilie Boireaux et Renée Isber, je vous remercie pour vos sessions bail du vendredi qui ont bifurqué vers les bails du samedi.

Je tiens également remercier celui qui a toujours été là pour les meilleurs et les mauvais moments de la thèse : Brett Davis.

# Abréviations

ABC : Cellules B activées

AITL : lymphome T angioimmunoblastique

ALCL : lymphome T anaplasique à grandes cellules

ATLL: lymphome T adulte

BAFF : B cell activating factor

BB: *Borrelia burgdorferi*

BCL : « B-cell Receptor »

bHLH : Basic-helix-loop-helix

BL: lymphome de Burkitt

CG : Centres germinaux

CLP: Common lymphoid progenitor

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP: Common Myeloid Progenitor

Complexe AICD: Activation-induced cell death

CP : Cryptopatch

CPA : cellules présentatrices de l'antigène

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CVP : Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone

DLL1 ou 4 : Delta 1 ou 4

DN : Double négatif

DP: Double positif

EBV : Virus Epstein Barr

ET: Early Thymic Progenitor

FL: lymphome folliculaire B

FoB : Cellule B Folliculaire

FT : Facteur de Transcription

GMPs : progéniteurs granulocyte-macrophage

GS : Gamma-sécrétase

GSI : Inhibiteur à la gamma-sécrétase

HeH : « high » hyperdiploïdes

HP : *Helicobacter pylori*

ICN-1, NICD1 : Domaine intracellulaire de NOTCH1

ICN-2, N2IC : Domaine intracellulaire de NOTCH2

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukines

IL-7R : Récepteur à l'interleukine 7

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IR : Interférons

ITAM : « Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif »

IPP : Inhibiteur de pompes à protons

JM : juxtamembranaire

KI : Knock in

KO : Knock out

LA : Leucémies aiguës

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LALT : Leucémie aiguë lymphoblastique T

LALB : Leucémie aiguë lymphoblastique B

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LB : Lymphocyte B

LPC-ZM : Lymphome primaire cutané

LT : Lymphocyte T

LT-CSH : « Long-terme » cellule souche hématopoïétique

LZM : Lymphome de la zone marginale

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)

MCL : lymphome à cellules du manteau

MEPs : progéniteurs mégacaryocyte-érythrocyte

MF : mycosis fongoïde

MO : Moelle osseuse

MPP : Multipotent Progenitor

MTX : Méthotrexate

MW : Macroglobulinémie de Waldenström

MzB : Cellule B de la zone marginale

NH : Non-Hodgkiniens

NK : Natural Killer

PTK : Protéine à Tyrosine Kinase

RC : Réponse complète

R-CHOP : Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, vincristine (Oncovin)

RTK : Récepteur à la tyrosine kinase

SCF : Stem Cell Factor

SLC : la chaîne légère de substitution

SMZL : Lymphome B de la zone marginale de la rate

SP : Simple positif

SS : Syndrome de Sézary

ST-CSH : « court-terme » cellule souche hématopoïétique

TCR : « T-cell Receptor

TSS : Transcriptional Start Site

VHC : Virus de l'hépatite C

ZM : Zone marginale

# Table des matières

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE 1 : LA LYMPHOPOÏÈSE NORMALE</b>	<b>13</b>
1. LYMPHOPOÏÈSE T	14
2. LA LYMPHOPOÏÈSE B	17
3. Maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires	19
4. REGULATION DE LA LYMPHOPOÏÈSE	22
4.1. Récepteurs des antigènes et signalisation	22
4.2. La régulation des lymphocytes T (LT) par l'activation du TCR	23
4.3. La régulation des lymphocytes B (LB) par l'activation du BCR	25
<b>CHAPITRE 2 : LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH</b>	<b>27</b>
1. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH : ORIGINE ET MECANISME	27
2. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH DANS LA LYMPHOPOÏÈSE NORMALE	29
2.1. La voie de signalisation NOTCH1 dans la différenciation des LT	29
2.2. La voie de signalisation NOTCH2 dans la différenciation des MzB	31
3. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH DANS LES HEMOPATHIES	35
3.1. La voie de signalisation NOTCH1 dans les leucémies T aiguës (LAL-T)	37
3.2. La voie de signalisation NOTCH dans les lymphomes B	44
<b>CHAPITRE 3 : LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH DANS LES LYMPHOMES B DE LA ZONE MARGINALE DE LA RATE (SMZL)</b>	<b>45</b>
1. DONNEES CLINIQUES	46
2. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH DANS LES SMZL	48
3. LES TRAITEMENTS DISPONIBLES POUR TRAITER LES PATIENTS SMZL	51
3.1. LA SPLENECTOMIE	52
3.2 TRAITEMENT A BASE DE RITUXIMAB	52
<b>OBJECTIF DE LA THESE</b>	<b>54</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>56</b>
<b>Abstract</b>	<b>57</b>
<b>Introduction</b>	<b>58</b>
<b>Materials and Methods</b>	<b>59</b>
<b>Results</b>	<b>65</b>
<b>Discussion</b>	<b>71</b>
<b>References</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSIONS DE L'ARTICLE</b>	<b>97</b>
<b>RESULTATS SUPPLEMENTAIRES</b>	<b>98</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES : RESULTATS SUPPLEMENTAIRES</b>	<b>123</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>130</b>

**PERSPECTIVES** **146**

---

**CONCLUSION GENERALE** **147**

---

**BIBLIOGRAPHIE** **149**

---

# Index des Figures

<b><u>FIGURE 1 : DU MODELE HIERARCHIQUE VERS UN MODELE DE CONTINUUM DE L'HEMATOPOÏESE</u></b>	<b><u>12</u></b>
<b><u>FIGURE 2 : SCHEMA DE LA STRUCTURE DU RECEPTEUR TCR SPECIFIQUE DES LT ET DE LA RECOMBINAISON V(D)J DES TCR.</u></b>	<b><u>16</u></b>
<b><u>FIGURE 3 : SCHEMA DE LA LYMPHOPOÏESE T CHEZ LA SOURIS.</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>FIGURE 4 : SCHEMA DU RECEPTEUR BCR SPECIFIQUE DES LB.</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>FIGURE 5 : SCHEMA DE LA LYMPHOPOÏESE B.</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b><u>FIGURE 6 : LA SIGNALISATION DU TCR.</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>FIGURE 7 : SIGNALISATION DU BCR</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>FIGURE 8 : LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>FIGURE 9 : SCHEMA DE L'IMPLICATION DE L'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH1 DANS LA DIFFERENCIATION DES LT</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>FIGURE 10 : LA MATURATION DES LB DANS LA RATE SCHEMA ILLUSTRANT LES SIGNAUX REQUIS POUR LE DESTIN CELLULAIRE DES CELLULES B IMMATURES DANS LA RATE.</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b><u>FIGURE 11 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES CELLULES CANCEREUSES.</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b><u>FIGURE 12 : ILLUSTRATION DES FORMES ONCOGENIQUES DE NOTCH1 DANS LES LAL-T.</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b><u>FIGURE 13 : MORPHOLOGIE SPLENIQUE CARACTERISTIQUE DU SMZL.</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b><u>FIGURE 14 : LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH MUTEE DANS LES SMZL.</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b><u>FIGURE 15 : CONSEQUENCE DE LA MUTATION GAIN-DE-FONCTION DE NOTCH2 RETROUVEE CHEZ LES PATIENTS SMZL.</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>FIGURE 16 : L'IMPACT DES MUTATION AU NIVEAU DE LA VOIE DE NOTCH2 SUR LES CONSEQUENCES CLINIQUES DES PATIENTS SMZL.</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>FIGURE 17 : SCHEMA EXPLICATIF DE L'OBJECTIF DE MA THESE.</u></b>	<b><u>55</u></b>

**FIGURE 18 : MYC REGULE DE NOMBREUSES FONCTIONS CELLULAIRES ET EST UNE CIBLE  
THERAPEUTIQUE DIFFICILE A TRAITER DIRECTEMENT. ....145**

**FIGURE 19 : IDENTIFICATION DE L'EFFECTEUR MYC COMME ETANT UN POTENTIEL EFFECTEUR  
DIRECT DE NOTCH2 POURRAIT ETRE ENVISAGE COMME UNE MEILLEURE CIBLE THERAPEUTIQUE.  
.....148**

## Index des tableaux du manuscrit

TABLEAU 1 : FREQUENCES DES MUTATIONS ENTRE LES LAL-T ADULTES ET LES LAL-T PEDIATRIQUES.....	39
TABLEAU 2 : LES TRAITEMENTS UTILISEES CONTRE NOTCH1 DANS LES LAL-T ET LEURS STADES DE TESTS CLINIQUES. ....	43

## Avant-Propos

Le sang est un liquide qui permet d'acheminer les nutriments, l'oxygène et les cellules immunitaires afin de lutter contre les infections et d'assurer un bon fonctionnement des organes. Il évacue également les déchets toxiques produits par les cellules (CO<sub>2</sub>, ammoniac). Le sang est composé de cellules sanguines en suspension dans un liquide jaunâtre appelé le plasma. Le volume total du sang d'un adulte humain est de 5 litres. La morphologie des cellules sanguines peut être étudiées à l'aide de colorant tel que le May Grunwald Giemsa (MGG). Il existe trois grandes classes cellulaires :

- Les érythrocytes (globules rouges) qui représentent 4,5 à 5,5 millions cellules/mm<sup>3</sup>. Ces cellules permettent les échanges gazeux dans l'organisme par l'intermédiaire de l'hémoglobine.
- Les leucocytes (globules blancs) qui représentent 4000 à 10 000 cellules/mm<sup>3</sup>. Ces cellules assurent la défense de l'organisme face aux pathogènes (virus, bactéries).
- Les thrombocytes qui vont permettre la production de plaquettes issue du cytoplasme des cellules mégacaryocytaires (150 000 à 400 000/mm<sup>3</sup>). Ces cellules assurent la coagulation du sang lors de l'apparition d'une lésion afin d'éviter une hémorragie.

Les leucocytes regroupent les cellules de l'immunité innée telles que les monocytes, les cellules dendritiques, les granulocytes et les cellules NK (« Natural Killer) et les cellules de l'immunité acquise ou adaptative assurées par les lymphocytes B et T.

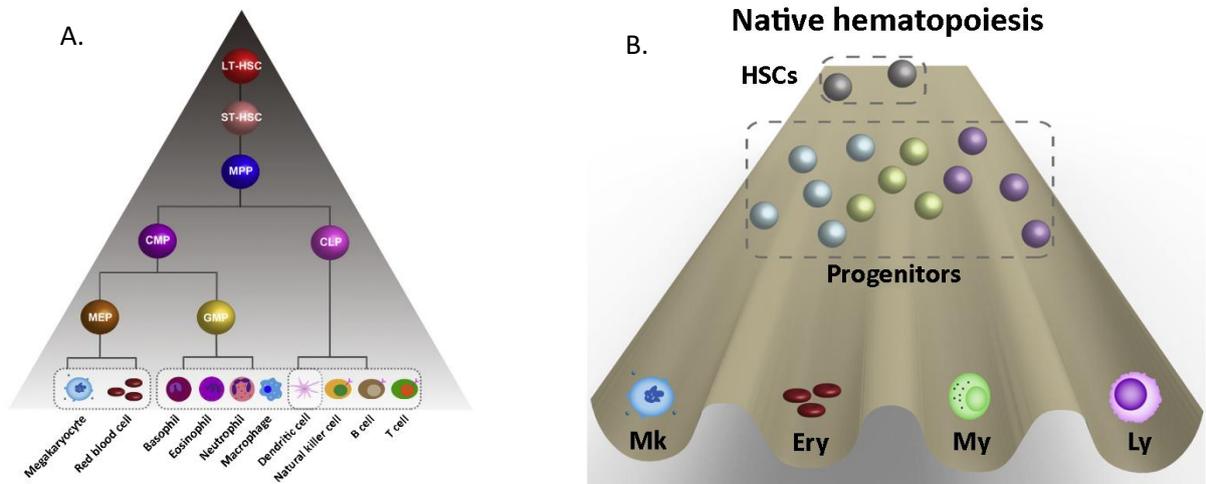
Les cellules sanguines ont des durées de vie variables et limitées dans le temps selon le type cellulaire. Elles sont renouvelées en continue tout au long de la vie d'un individu : du développement embryonnaire à l'âge adulte. L'hématopoïèse est l'ensemble des processus physiologiques qui permet la production, la maturation, la libération des différentes cellules matures et le réapprovisionnement en continu des cellules

sanguines. L'hématopoïèse permet donc d'assurer le maintien de l'homéostasie du sang. Les différents travaux réalisés de 1940 à 1980, notamment ceux de Till et McCulloch sur la greffe de cellules murine de la moelle osseuse dans des souris irradiées (Till et McCulloch 1961, 1980) ont permis de décrire les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation d'une même cellule. Ces cellules situées en amont de la production des cellules sanguines sont appelées : cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH sont capables de s'autorenouveler et de se différencier vers l'ensemble des cellules du sang.

L'hématopoïèse chez les mammifères est classiquement décrite comme un processus hiérarchisé avec comme précédemment mentionné, à son sommet les CSH. L'hématopoïèse embryonnaire diffère de l'hématopoïèse adulte par sa localisation, l'hématopoïèse embryonnaire a lieu dans le foie fœtal et la rate et l'hématopoïèse adulte a lieu dans la moelle osseuse (MO), son organisation, son programme transcriptionnel et les capacités de prolifération des CSH (Revue, Barbovic et Eaves, 2014).

Les CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents (MPP) avant de se différencier en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ou en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les CLP se différencient uniquement en lignée lymphoïde tandis que les CMP peuvent se différencier en progéniteurs mégacaryocyte-érythrocyte (MEPs) et en progéniteurs granulocyte-macrophage (GMPs) (Figure 1A). Les cellules matures ( $Lin^+$ ) présentent des marqueurs spécifiques des cellules myéloïdes (Gr1, Mac1), des cellules érythroïdes (Ter119), des mégacaryocytes (CD41, CD42), des lymphocytes T (CD3 et TCR) et des lymphocytes B (B220, CD19 et BCR). Les études faites pour définir la modélisation hiérarchique de l'hématopoïèse ont permis par la suite de mettre en évidence qu'il s'agit d'un processus de différenciation continu aboutissant à une hétérogénéité des progéniteurs et cellules hématopoïétiques. Ainsi,

cela souligne l'existence d'un continuum sans réels états discrets (Figure 1B) (Cabezas-Wallscheid et al., 2014, Rodriguez-Fraticelli et al., 2018, revue Zhang et al., 2018).



**Figure 1 : Du modèle hiérarchique vers un modèle de continuum de l'hématopoïèse**

Figures issues de la revue de Zhang et al., 2018. A. Schéma classique de l'arborescence du modèle hématopoïétique  
 B. Représentation de l'hématopoïèse sous forme de continuum. Mk : mégacaryocytes, Ery : Erythrocytes, My : myélocytes et Ly : lymphocytes.

# INTRODUCTION

## Chapitre 1 : La lymphopoïèse normale

Les cellules de l'immunité innée qui comprennent les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules « Natural Killer » (NK) et les granulocytes (mastocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles) sont la première ligne de défense de l'organisme pour éliminer un grand nombre de pathogènes. De plus, il existe un autre système de défense en parallèle qui est complémentaire de celui-ci. Il s'agit de l'immunité acquise ou adaptative. L'immunité acquise comprend l'ensemble des processus permettant la production de nouveaux lymphocytes, incluant les lymphocytes B (LB) dans la moelle osseuse (MO) et les lymphocytes T (LT) dans le thymus aboutissant à la production des cellules mature « naïves ». Ce processus est ce qu'on appelle la lymphopoïèse. Durant l'évolution, les cellules issues de l'immunité adaptative ont permis de fournir de nombreux panels de répertoires spécifiques et variés pour la reconnaissance du soi et du non-soi. La lymphopoïèse est décrite à partir des CLP caractérisés par les marqueurs de surface CD34, Flt3 et Kit<sup>low</sup> et par l'expression du récepteur de l'interleukine 7 (IL-7R) chez la souris (Kondo et al., 1997). La lymphopoïèse T et B ainsi que les mécanismes de régulation seront décrits dans les différentes parties de ce sous-chapitre.

Les étapes de lymphopoïèse T et B sont caractérisées par l'expression de protéines membranaires et des récepteurs spécifiques aux cellules T (TCR pour « T-cell Receptor ») et aux cellules B (BCR pour « B-cell Receptor »). Les récepteurs transmembranaires TCR et BCR sont spécifiques d'un antigène. Durant le développement des lymphocytes, la génération des domaines du TCR et BCR reconnaissant spécifiquement l'antigène se fait par des mécanismes de recombinaison des segments des gènes V(D)J (Variable, Diversité et Jointure : V, D, J) grâce aux enzymes recombinases Rag1 et Rag2 (Oettinger et al., 1990). Ces mécanismes moléculaires impliquant les gènes V(D)J composés de

nombreux segments et de multiples recombinaisons possibles conduisent à une haute diversité de récepteurs (de l'ordre de  $10^{13}$  différents récepteurs) (Tonegawa, 1983, revue Calis et Rosenberg, 2014).

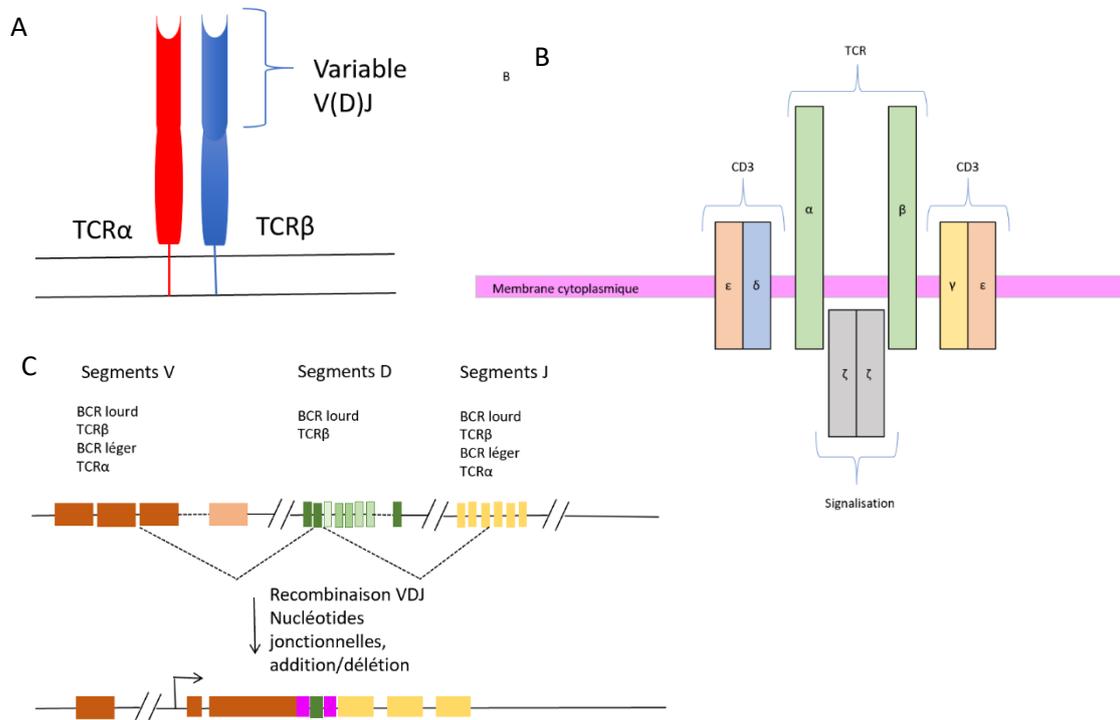
Les recombinaisons se font en deux temps en fonction des chaînes concernées et sont associées à des stades précis de différenciation qui seront décrites dans les sous-chapitres. La première recombinaison conduit à l'expression d'un pré-TCR ou pré-BCR, puis la seconde à l'expression d'un TCR ou BCR fonctionnel.

### 1. Lymphopoïèse T

La lymphopoïèse T s'effectue à partir de progéniteurs lymphoïdes qui migrent vers le thymus où la maturation et la sélection des lymphocytes T (LT) se feront. Les progéniteurs thymiques perdent alors de leurs capacités d'auto-renouvellement. Le développement des LT est divisé en 3 grandes étapes en fonction des marqueurs CD4 et CD8 : le stade double négatif ( $CD4^- CD8^-$ ), le stade double positif ( $CD4^+ CD8^+$ ) et les stades simple positif ( $CD4^- CD8^+$  ou  $CD4^+ CD8^-$ ) (Revue Famili, Wiekmeijer, and Staal 2017). Les études *in vivo* effectuées sur la souris ont permis de caractériser les étapes de la lymphopoïèse T ainsi que les fonctions des LT. La première étape est caractérisée par les cellules progénitrices de la MO qui sont doubles négatives (DN) c'est-à-dire que ces cellules n'expriment pas les corécepteurs CD4 et CD8 ( $CD4^- CD8^-$ ). Les DN sont principalement subdivisées en 4 groupes en fonction de leurs marqueurs de surface CD25 et CD44 qui sont respectivement le récepteur de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'acide hyaluronique (Godfrey et al., 1993). Les DN1 sont  $CD25^- CD44^+$  et contiennent des « early thymic progenitors » (ETP) qui donneront naissance aux DN2 qui expriment le CD25 ( $CD25^+ CD44^+$ ) (Porritt et al., 2004). Quant au stade DN3, cela est caractérisé par la perte du marqueur CD44 ( $CD4^- CD8^- CD44^- CD25^+$ ). Comme mentionné précédemment, l'assemblage somatique des gènes du TCR (*Tcra*, *Tcrb*, *Tcrg*, *Tcrd*) génèrent une diversité dans le répertoire des LT. L'expression des gènes *Rag* débute au stade DN2, ce qui permet la recombinaison des gènes *Tcrd*, *Tcrg* et *Tcrb*. Cela

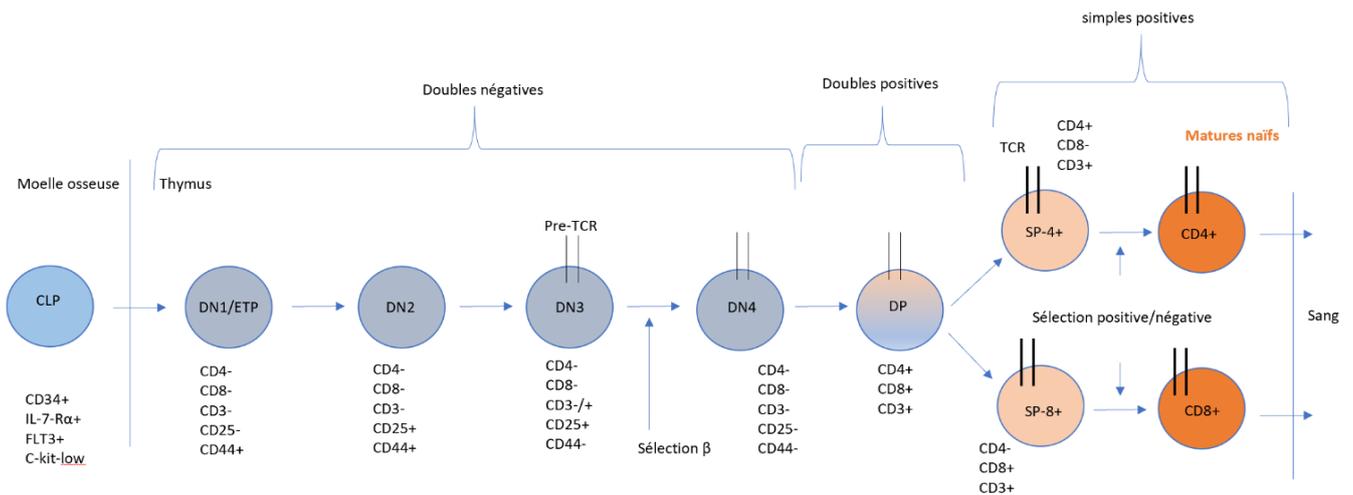
conduit à la formation du pré-TCR au stade DN3. Les TCR sont composés de deux chaînes et il en existe deux types : soit  $\alpha\beta$  pour les lymphocytes  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  (Figure 2a) soit les  $\gamma\delta$  pour les LT non conventionnels. Lors du stade DN3, l'arrêt du cycle cellulaire permet le réarrangement des segments du gène *Tcrb* qui codent pour la région variable de la chaîne  $\beta$  du récepteur (Capone et al., 1998). Ces réarrangements conduisent à l'expression d'une chaîne  $\beta$  qui sera exprimée à la surface des DN3 avec une pré-chaîne  $\alpha$  invariante pour former le pré-TCR. Ce pré-TCR, associé aux molécules CD3 (CD3  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  et deux chaînes  $\zeta$ ), permet la transduction de signaux conduisant à la répression des gènes *Rag*, à la prolifération, la survie et la différenciation des DN3 et DN4 qui perdent l'expression de CD25 (Figure 2b-c). Si la chaîne  $\beta$  n'est pas correctement réarrangée, la transduction des signaux n'a pas lieu et les DN3 sont éliminés par apoptose. Cette étape est appelée sélection  $\beta$  (Krangel et al., 2009). La deuxième grande étape est caractérisée par des cellules doubles positives (DP) qui ont acquis les marqueurs  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . A ce stade, un nouvel arrêt du cycle cellulaire permet le réarrangement des segments de la chaîne  $\alpha$ . Le  $TCR\alpha\beta$  exprimé à la surface des cellules est alors associé aux corécepteurs CD4 ou CD8 et définit la troisième étape avec des cellules simples positives. Les cellules simples positives subissent deux sélections dépendantes du signal reçu. Une première est dite positive et permet de tester la fonctionnalité du  $TCR\alpha\beta$ . La reconnaissance des peptides du soi qui sont intégrés dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) est critique pour déterminer le destin des cellules  $T\alpha\beta$ . La sélection positive des thymocytes permet donc la survie des cellules qui s'engagent soit dans la lignée des cellules T  $CD4^+$  (aussi appelé « helper ») soit dans la lignée des cellules T  $CD8^+$  (aussi appelé cytotoxique). D'autre part, il existe aussi une sélection négative qui permet d'éliminer par apoptose ; les cellules  $TCR\alpha\beta$  auto-réactives c'est-à-dire les cellules qui reconnaissent les antigènes du soi (Surh et Sprent, 1994, Revue Klein et al., 2014). A l'issue de ces étapes, les LT  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  sont dits « naïfs » passent dans la circulation sanguine à la recherche d'antigènes du non-soi qui

pourront être reconnu par leur TCR entraînant leur activation (phase dépendante de l'antigène rencontré). Les étapes de la lymphopoïèse T sont illustrées dans la figure 3.



**Figure 2 : Schéma de la structure du récepteur TCR spécifique des LT et de la recombinaison V(D)J des TCR.**

(A) Le TCR est un récepteur transmembranaire composé deux différents sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et de deux grandes parties : fixe et variable. La partie variable étant la partie où l'antigène se lie. Cette partie variable code pour les gènes V(D)J (TCR $\beta$ ). (B) Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont associées avec les molécules CD3 et CD4 ou CD8 permettant la transduction du signal. (C) : Mécanisme de recombinaison V(D)J qui permet la diversification de l'anticorps. Schéma illustrant le mécanisme de recombinaison V(D)J qui a lieu au niveau du locus TCR $\beta$ . Les nombres différents des segments des gènes V(D)J, V (orange), D (vert), J (jaune) sont représentés pour chaque récepteur d'antigène. Pendant la recombinaison, des nucléotides peuvent être ajoutés ou délévés au niveau des jonctions de segments (violet) contribuant à une séquence additionnelle.



**Figure 3 : Schéma de la lymphopoïèse T chez la souris.**

Les CLP provenant de la MO migrent vers dans le thymus où la lymphopoïèse T a lieu. La lymphopoïèse T peut se diviser en 3 grandes étapes : les cellules doubles négatives (DN1 à DN4) suivi des cellules doubles positives (DP) et enfin les cellules simples positives (SP et CD4+ / CD8+).

## 2. La lymphopoïèse B

La génération des LB par les CLP a lieu dans la MO. De nombreux groupes ont décrit les différents stades de différenciation B. Deux principales nomenclatures sont utilisées : celle de Philadelphie développée par Hardy et ses collaborateurs ; Fraction (Fr.) A, B, C, C', D, E et F (Hardy et al., 1991) et celle de Bâle développée par Melchers et ses collaborateurs ; pré-pro, pro ou preBI, pré-B ou pre-BII et immatures (F. Melchers, 1995). Ces deux nomenclatures ne se recouvrent pas totalement. Les étapes de différenciation de la lymphopoïèse B seront illustrées dans la figure 5.

De nombreux travaux réalisés chez la souris ont permis de montrer que les CLP qui s'engagent vers la lignée B acquièrent les marqueurs B220 ou CD45R, CD43 et maintiennent l'expression de l'IL-7R à leur surface. Les progéniteurs perdent de façon précoce l'expression du récepteur Kit. Les progéniteurs perdent l'expression de *Kit* dès le stade pré-proB / Fr.A (Payne et al., 1999). Les cellules pré-proB se différencient par la suite en lymphocytes pro-B (pré-BI ; early (Fr.B) et late (Fr. C) qui sont caractérisés

par l'expression de CD19, spécifique de l'engagement B comme le marqueur B220. Les pro-B expriment les gènes *Rag1* et *Rag2* nécessaires pour la formation du pré-BCR (Hardy et al., 1991). Le pré-BCR est exprimé à la fin du stade pro-B. Il est composé de deux chaînes lourdes d'immunoglobuline (IgH) identiques réarrangées (Alt et al., 1984) associées à deux pré-chaînes légères de substitution (IgL) invariables codant pour VpréB et  $\lambda 5$  (Karasuyama et al., 1990). Au stade pré-BI, les deux allèles de l'IgH subissent une recombinaison des segments de gènes D (diversité) et J (Jointure) (recombinaison DJ<sub>H</sub>). Les allèles IgH ayant subi le réarrangement VDJ complet, sont donc fonctionnels et codent pour la chaîne protéique  $\mu$ H qui est exprimée sur la surface des cellules. Lorsque le pré-BCR est correctement réarrangé et associé aux pré-IgL, aux Ig $\alpha$  (CD79a) aux Ig $\beta$  (CD79b), cela va entraîner une transduction des signaux. L'Ig $\alpha$  et l'Ig $\beta$  sont des glycoprotéines transmembranaires appartenant à la superfamille des Ig formant un hétérodimère indispensable pour la transduction des signaux du récepteur BCR. Ce mécanisme, appelé sélection positive, permet de passer au stade pré-B (pré-BII) sinon les cellules sont éliminées en grande majorité par apoptose. Les lymphocytes du stade pré-BII sont caractérisés par un réarrangement VDJ complet des deux allèles IgH et expriment B220, CD19 et CD25 (récepteur à l'IL-2). Une perte de l'expression de CD43 est aussi observée. (Rolink et al., 1994). Cette signalisation issue de ce pré-BCR induit aussi la diminution de l'expression des gènes *Rag* (Grawunder et al., 1995) et une phase d'expansion des « large » pré-B (Fr. C') (Martensson et al., 2002). Les récepteurs pré-BCR induisent la prolifération des cellules (Rolink et al., 2000). Au cours des différents stades de développement, les cellules entrent en quiescence au stade « small » pré-B (Fr. D). La sortie du cycle cellulaire par la signalisation du pré-BCR conduit à la répression de la cycline D3 (Mandal et al., 2009). Les gènes *Rag* sont alors réexprimés pour permettre le réarrangement des IgL $\kappa$  ou IgL $\lambda$ . Des études sur les souris déficientes pour les facteurs de régulation de l'interférons 4 et 8 (*Irf4*<sup>-/-</sup> et *Irf8*<sup>-/-</sup>) ont montré que ces facteurs sont nécessaires *in vivo* pour l'initiation de la recombinaison de l'IgL $\kappa$ , la sortie du cycle cellulaire et la suppression du complexe de la chaîne légère de

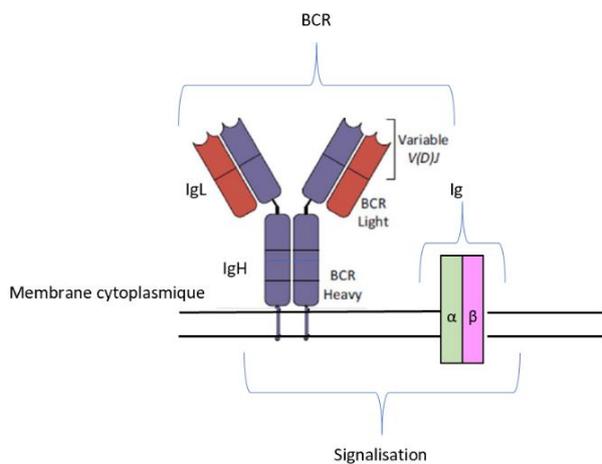
substitution (SLC) (Lu. R et al., 2003, Ma. S et al., 2008). Cela permet la formation d'un récepteur BCR fonctionnel (Figure 4) (Liu et al., 1997, Revue Herzog, Reth et Juma, 2009). Le récepteur BCR est composé de deux chaînes lourdes (IgH) et de deux chaînes légères (IgL) composées de régions constantes et variables. Le BCR, entièrement réarrangé, est exprimé à la surface de cellules B immatures (Fr. E). Chaque LB exprime un BCR unique. Les BCR interagissent avec les antigènes du soi. La qualité du signal induit permet la sélection des cellules. Des mécanismes de tolérance ont lieu à des stades du développement tardif. La tolérance dite centrale a un rôle clé dans la réduction des fréquences de cellules auto-réactives. En effet, grâce à la sélection négative, ces cellules sont éliminées par apoptose (Surh et Sprent, 1994 et Revue Nemazee, 2017). Ainsi, selon l'intensité du signal du BCR, cela peut soit entraîner une apoptose si le signal est fort soit une poursuite de la maturation dans les organes secondaires lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques) si le signal est intermédiaire (Revue Melchers, 2015). Les immunoglobulines, dont fait partie le BCR, se différencient par la partie constante du BCR. Les cellules immatures sont caractérisées par l'expression de l'IgM et les cellules matures (Fr. F) par la co-expression de l'IgM et de l'IgD à leur surface (Lala et al., 1979). Les cellules matures naïves circuleront dans le sang à la recherche d'antigènes étrangers grâce à leur BCR fonctionnel, ce qui permettra leur activation (phase dépendante de l'antigène). L'ensemble des étapes de la lymphopoïèse B est présenté dans la figure 5.

### 3. Maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires

Une fois que les LB immatures quittent la MO, ils sont acheminés par la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires. Parmi les organes secondaires lymphoïdes, La rate est le plus grand organe appartenant au système immunitaire du corps humain. Elle a pour rôle d'initier les réactions immunes face aux antigènes via la circulation générale. Elle a également un rôle dans l'élimination des érythrocytes

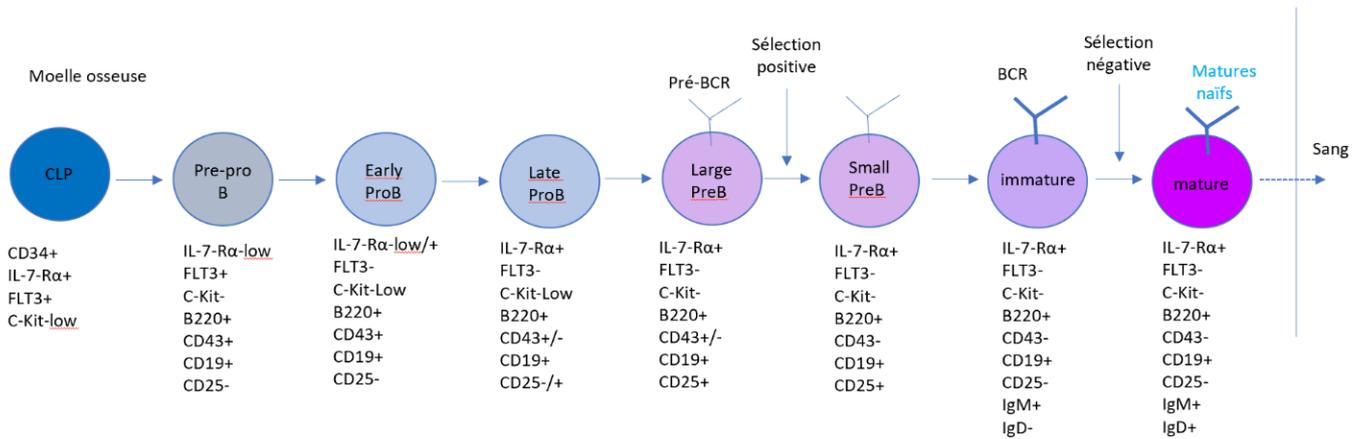
sénescents. La rate est subdivisée en deux principaux compartiments : la pulpe rouge (partie myéloïde) et la pulpe blanche (partie lymphoïde). La pulpe blanche est divisée en deux sous-compartiments : les follicules et la zone marginale. Ainsi, dans la majorité des cas, les LB immatures vont migrer dans la rate, dans la pulpe blanche, où ils vont subir une maturation soit au niveau de la zone folliculaire (FoB) ou soit au niveau de la zone marginale (MzB) (Kumararatne et al., 1981 et Martin et Kearney, 2002). Les FoB sont de petites tailles et expriment les immunoglobulines M à bas niveau et D à haut niveau (IgM<sup>low</sup> IgD<sup>hi</sup>) tandis que les MzB sont de tailles moyennes et présentent comme caractéristiques IgM<sup>hi</sup> IgD<sup>low</sup> (Kumararatne et al., 1981). Les FoB exprimant IgM<sup>low</sup> IgD<sup>hi</sup> CD21<sup>mid</sup> sont appelées les cellules folliculaires de type I (FoBI). Il existe aussi une seconde population de FoB exprimant IgM<sup>hi</sup> IgD<sup>hi</sup> CD21<sup>mid</sup>, cette population est ce qu'on appelle les cellules folliculaires de type II (FoBII). Cette dernière est en faible quantité par rapport au MzB. Les FoBII ont la capacité de reconstituer le compartiment des cellules MzB. Ce qui permet donc d'avoir un réservoir lorsque les MzB sont rapidement déplétées lors de leur activation par un antigène (Pillai S et Cariappa A, 2009). Les follicules sont adjacents à la zone des LT, ce qui permet lorsque les cellules B folliculaires sont activées ainsi que des LT « helpers », de migrer et d'interagir à l'interface entre les 2 zones. Ainsi, ces FoB participent aux réponses immunes en réponse à un antigènes dépendantes des LT. Les MzB expriment fortement les marqueurs CD21 et CD1d. Le haut niveau d'expression de CD1d permet de faciliter la présentation des lipides des antigènes aux cellules NK (Leadbetter EA et al., 2008, Barral P et al., 2008) et le transport de complexe immunitaire de la circulation sanguine aux follicules. Ce complexe peut être capturé par les cellules dendritiques folliculaires pour ensuite permettre la présentation aux cellules FoB. Les cellules B immatures ayant acquis la capacité de recirculer sont ce qu'on appelle des cellules B T1 (Transitionnelle 1), ces cellules T1 sont généralement situées dans la MO ou dans la rate. Les cellules B immatures nouvellement générée qui entrent dans les follicules acquièrent comme marqueurs de surface IgD et CD23 mais restent à un stade immature. Ces cellules B

immatures qui ont la capacité de recirculer sont ce qu'on appelle des cellules B T2 (Transitionnelle 2) (Allman D et al., 2001). Les cellules T1 B peuvent se différencier en cellules indépendantes des signaux BAFF (« B cell activating factor ») et de BTK c'est-à-dire en FoBII ou en FoBI si elles sont dépendantes de ces signaux. La décision du destin cellulaire est dépendante du signal du BCR et de la participation de la voie de signalisation de NOTCH2 (mécanismes seront détaillés dans le chapitre 2).



**Figure 4 : Schéma du récepteur BCR spécifique des LB.**

Le BCR est composé de 2 chaînes lourdes (IgH) et de 2 chaînes légères (IgL) en association avec les molécules  $Ig\alpha\beta$  pour permettre la transduction du signal. Le schéma du BCR est issu de la revue Calis et Rosenberg, 2014.



Hardy	A	B	C	C'	D	E	F
Melchers	PreproB	PreBI		PreBII		Immature	Mature

**Figure 5 : Schéma de la lymphopoïèse B.**

Chez la souris, la lymphopoïèse B peut être illustrée par l'acquisition ou la perte successives de plusieurs marqueurs de surface représentés dans le schéma. Les noms des différents stades proposés par la classification de Philadelphie (Hardy) et de Bâle (Melchers) sont exposés dans le tableau.

#### 4. Régulation de la lymphopoïèse

##### 4.1. Récepteurs des antigènes et signalisation

Les pré-récepteurs et récepteurs spécifiques des LT et LB sont essentiels pour la transmission de signaux intracellulaires permettant la maintenance, la prolifération et la différenciation de ces cellules à des stades spécifiques. L'Ig membranaire exprimée par les lymphocytes B (BCR) reconnaît les antigènes sous forme soluble et le récepteur TCR reconnaît le complexe peptide antigénique-CMH exprimé à la surface des cellules présentatrices des antigènes (CPA). L'interaction des récepteurs avec leurs ligands situés à la surface des CPA induit une cascade de signalisations aboutissant à l'activation des cellules et à l'internalisation des complexes formés dans des vésicules, qui sont par la suite transportés dans des endosomes et des lysosomes. Les récepteurs TCR et BCR comme mentionné dans la partie lymphopoïèse T et B sont respectivement

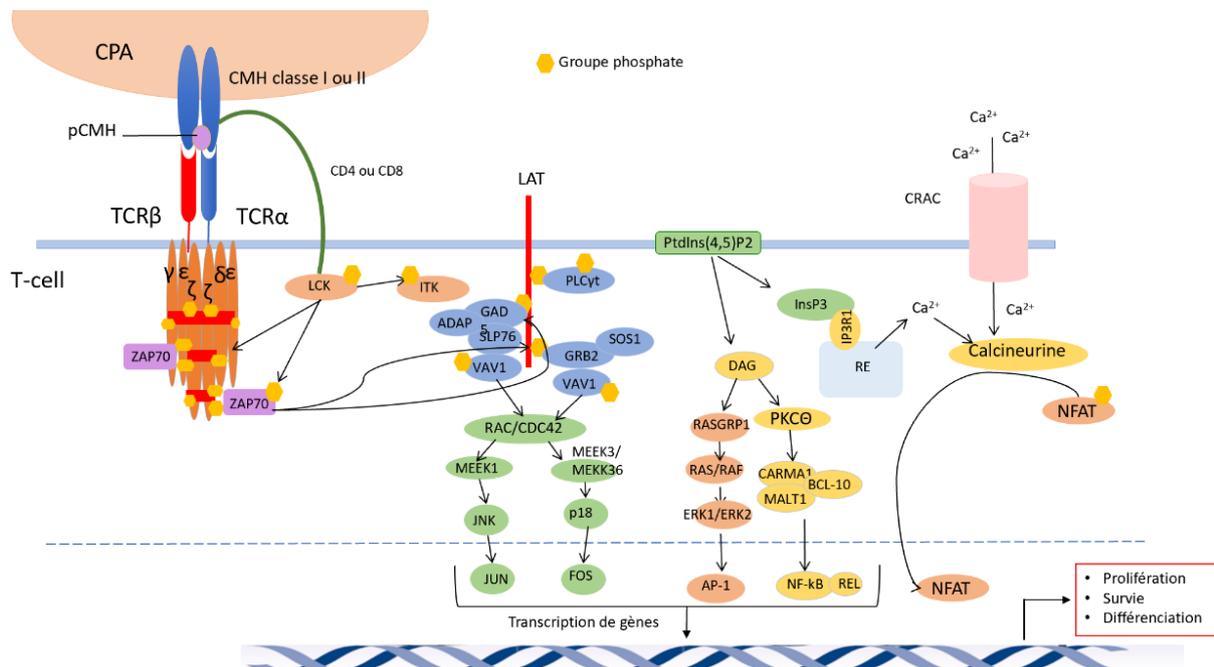
couplés à des chaînes invariantes dites « accessoires » qui assurent la transduction du signal et le maintien de l'expression des récepteurs à la surface des cellules. Pour le récepteur TCR, il s'agit du complexe CD3 ( $\delta, \gamma$  et  $\epsilon$ ) et deux chaînes  $\zeta$  et les molécules CD79 ( $Ig\alpha/\beta$ ) pour le récepteur BCR. Les molécules CD3 et CD79 possèdent des motifs conservés se situant au niveau de leurs domaines intracytoplasmiques. Ces motifs correspondent à des motifs ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif ») nécessaires à la transduction du signal (Bonnerot, C et Hivroz C, 1999). Les mécanismes dépendants de ces récepteurs sont similaires dans la mesure où leur spécificité est assurée par les protéines accessoires et les corécepteurs associés au TCR ou BCR impliqué en fonction du lignage. Les domaines intracellulaires des corécepteurs CD4/CD8 et CD19, respectivement associés au TCR et BCR se lie aux protéines kinases de la famille SRC. La famille SRC est composée de 11 membres dont Src et Fyn et sont exprimées par toutes les cellules et Blk, Fgr, Hck, Lck et Lyn exprimés seulement par les cellules hématopoïétiques. Ces protéines ont 4 domaines d'homologie en commun : un domaine unique « SRC homology 4 » (SH4) et un domaine « SRC homology 3 » (SH3), un domaine « SRC homology 2 » (SH2) et un domaine kinase « SRC homology 1 » (SH1). Les domaines SH2 des protéines leur permettent d'interagir avec les résidus tyrosines phosphorylés d'autres protéines. Lorsque le domaine SH2 se fixe à une tyrosine phosphorylée, cela induit un changement de conformation des protéines SRC libérant leur domaine kinase qui peut alors être phosphorylé et conduire à l'activation de la protéine (Revue Roskoski, 2015). Lorsque le récepteur se lie à l'antigènes, cela induit donc un changement de conformation ce qui permet aux SRC de phosphoryler les résidus tyrosines des motifs ITAM des molécules CD79 et CD3.

#### 4.2. La régulation des lymphocytes T (LT) par l'activation du TCR

La protéine kinase Lck associée à CD4 ou CD8, phosphoryle les domaines ITAM du corécepteur CD3 $\epsilon$  et des deux chaînes  $\zeta$  (Van Oers et al., 1996). La protéine kinase ZAP70 est recrutée au niveau de CD3 $\zeta$  qui est lié aux ITAM phosphorylés via le domaine SH2 (Chan, A et al., 1992, Weiss A et al., 1994, Wange et al., 1993 et Hatada et al., 1995).

Ainsi, la phosphorylation de ZAP70 par Lck ou Fyn permet une activation du TCR. La protéine kinase ZAP70 phosphoryle à son tour, les résidus de la protéine transmembranaire Lat (« Linker for Activation of T cells ») et de la protéine d'échafaudage SLP-76 (Paz et al., 2001, Sela et al., 2001) qui a un rôle essentiel dans le maintien du complexe Lck/ZAP70 afin de permettre la transmission du signal en aval. La phosphorylation du complexe Lat/SLP-76 permet le recrutement en association avec des protéines adaptatrices et des kinases, de plusieurs effecteurs des voies de signalisation. Ces inductions de cascades de phosphorylation induisent l'activation des isoformes de la phospholipase C, la phospholipase C- $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ 1 ou PLC-  $\gamma$ 2) (Koretzky et al., 2006, Alvarez-Errico et al., 2009 et Kambayashi et al., 2007). En effet, la PLC-  $\gamma$ 1 se lie directement à la protéine Lat et la protéine SLP-76 se lie et active une protéine kinase de la famille Tec : Itk qui va par la suite phosphoryler les différents sites requis pour l'activation de cette voie (Liu et al., 1998, Houtman et al., 2005 et Bogin et al., 2007). PLC-  $\gamma$  clive le lipide membranaire PIP2 en diacylglycerol (DAG) et en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3), agissant comme second messager pour activer la protéine kinase C (PKC) et la libération de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Rhee SG et Bae, YS, 1997) dans le cytosol de la cellule qui va activer par la suite la phosphatase appelée calcineurine. Celle-ci déphosphoryle les facteurs de transcription NFAT1, 2 et 4 qui vont migrer par la suite dans le noyau pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la prolifération des LT. La PKC activée par le DAG, va entraîner l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B impliquée dans les réponses inflammatoires en phosphorylant son corépresseur I $\kappa$ B $\alpha$ . Le DAG permet également le recrutement de la protéine adaptatrice RasGRP qui activera RAS puis la cascade de signalisation RAS/MAPK (Ebinu et al., 2000). D'autre part, la voie RAS/MAPK est directement activée par la protéine Lat qui recrute des protéines adaptatrices Grb2 et Sos1. Cela va entraîner la formation du facteur de transcription AP-1 composé des protéines c-Fos, c-Jun, Atf et Jdp (Karin. M, 1995). L'ensemble de ces FT permet la

prolifération et la différenciation des LT. La signalisation du TCR est illustrée dans la figure 6 (Revue Gaud et al., 2018).



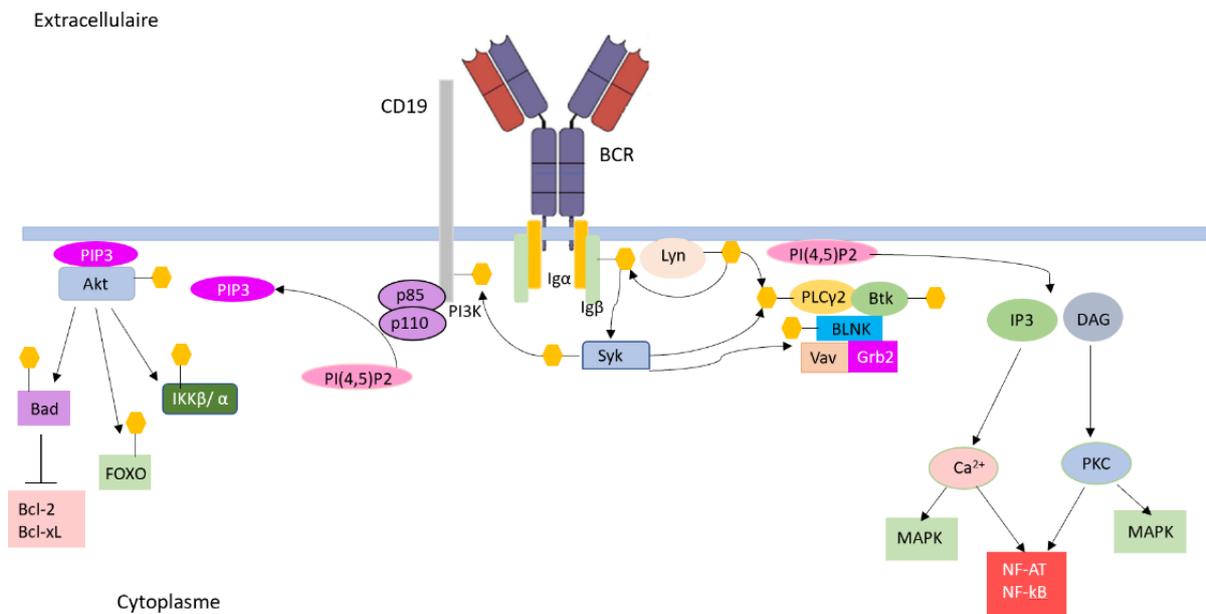
**Figure 6 : La signalisation du TCR**

Les principales voies de signalisation liées à l'activation du TCR sont représentées dans ce schéma. La transduction du signal du TCR lié avec le complexe CMH se trouvant à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA), entraîne donc une cascade de phosphorylation de différents effecteurs entraînant l'activation de ces principales voies de signalisation : RAS/MAPK, NF-κ et NFAT. En rouge sont représentés les domaines ITAM dans le complexe CD3 intracellulaire. Les petits points jaunes représentent les groupes phosphates. L'activation de ces principales voies de signalisation a pour but de permettre la survie des cellules LT, la prolifération et la différenciation des LT. RE = Réticulum endoplasmique.

#### 4.3. La régulation des lymphocytes B (LB) par l'activation du BCR

Lorsque le BCR est activé par une interaction avec un ligand, la transduction du signal est médiée par les deux hétérodimères Ig-α/Ig-β (CD79 α/β) qui possèdent des ITAMs. Trois familles distinctes de protéines tyrosines kinases cytoplasmiques (PTK) sont recrutées lors de l'activation du BCR. La famille des PTK Src (cf partie 4.1.1. LT) telle que la protéine Lyn qui est localisée en aval de la transduction BCR. L'activation par Lyn entraîne par la suite l'activation de la kinase Syk et de sa protéine d'échafaudage Blnk

(SLP-65 ou BASH) (Yamanashi et al., 1991, Tsang et al., 2008, Stepanek et al., 2013). La protéine Syk phosphoryle Blnk qui recrute alors la kinase Btk (Bruton Tyrosine Kinase). Le complexe Blnk/Btk, une fois phosphorylée, permet l'activation de la PLC $\gamma$  2 (Niuro, H et Clark EA, 2002) qui va par la suite réguler le flux de calcium dans le cytosol conduisant à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et RAS/MAPK qui va permettre la différenciation des LB. Ce complexe va également recruter la protéine Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 (Vav1) et le facteur de croissance : Grb2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) (Revue Geahlen RL, 2009). Ces deux protéines vont par la suite activer la voie RAS/MAPK (Fu et al., 1998, Yokozeki et al., 2003 et Vanshylla et al., 2018). La protéine Syk phosphoryle le corécepteur CD19 induit le recrutement et l'activation de la protéine p85 puis ensuite, l'activation de la sous-unité de PI3K de p110 ce qui entraîne donc l'activation de la voie PI3K/AKT (Yokozeki T et al., 2003, Otero et al., 2001 et Beitz LO et al., 1999). Le pré-BCR par la voie PI3K induit la phosphorylation du FT Foxo1 levant ainsi l'inhibition de la transcription des gènes *Rag* et conduisant aux réarrangements des chaînes légères IgM et donc à l'expression d'un BCR fonctionnel (Dengler et al., 2008 et revue Herzog, Reth et Jumaa, 2009). Cette régulation est ce qu'on appelle la cascade de signalisation positive médiée par la protéine Lyn. La protéine Lyn peut également induire une cascade de signalisation négative (Saijo, K et al., 2003 et Chan VW et al., 1997).



**Figure 7 : Signalisation du BCR**

Figure adaptée de la revue Brodie et al.,2018. Les principales voies de signalisation liées à l'activation du récepteur BCR sont représentées sur ce schéma. Lyn initie la cascade de signalisation du BCR après activation de celui-ci par un antigène (sous forme de peptide soluble). La stimulation du BCR entraîne donc l'activation de Lyn et Syk par phosphorylation (hexagone jaune) des domaines Ig  $\alpha/\beta$ . L'activité de la PLC $\gamma$ 2 entraîne l'hydrolyse du PI(4,5)P2 en IP3 et en DAG qui stimule, d'une part la libération de  $Ca^{2+}$  et d'autre part, l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la MAPK. La phosphorylation de CD19 entraîne un recrutement au niveau de la membrane du phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) et l'activation d'Akt induisant ainsi la phosphorylation des protéines en aval entraînant leurs inhibitions et d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation des LB.

## **Chapitre 2 : La voie de signalisation NOTCH**

### 1. La voie de signalisation NOTCH : origine et mécanisme

La voie de signalisation NOTCH a été découverte chez une souche de drosophiles haplo-insuffisantes exprimant un phénotype avec des ailes présentant des petites entailles (notch en anglais) au niveau de la bordure des ailes (Morgan, TH, 1917). La voie de signalisation NOTCH est une voie de signalisation hautement conservées entre les espèces. En effet, la voie NOTCH a une expression ubiquitaire et a un rôle essentiel dans les processus homéostatiques et développementaux tels que dans le destin

cellulaire, le maintien des cellules souches, la prolifération et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Chez l'humain, il existe 4 récepteurs Notch (1-4). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires de type I caractérisés par :

- Des séquences répétées EGF sur la partie extracellulaire
- D'une hétérodimérisation comprenant une partie extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire
- Des séquences répétées ankyrines sur la partie intracellulaire
- Une séquence signal de translocation dans le noyau NLS sur la partie intracellulaire
- Un domaine PEST (voir paragraphe suivant)

Seul les récepteurs NOTCH1 et NOTCH2 possèdent un domaine de transactivation transcriptionnel (TAD) bien caractérisé (Ellisen et al., 1991, Weinmaster et al., 1991, 1992, Lardelli et al., 1994 et Uyttendaele et al., 1996). Ces récepteurs NOTCH peuvent interagir avec 2 grandes familles de ligands : Delta (1, 3 et 4) et Jagged (1 et 2) qui comprennent tous deux des séquences répétées EGF et un domaine DSL impliqué dans l'interaction avec les récepteurs NOTCH (Lindsell et al., 1995, Shawber et al., 1996, Luo et al., 1997, Bettenhausen et al., 1995 et Dunwoodie et al., 1997) (Figure 8a). L'activation de la voie de signalisation NOTCH suit une stratégie de signalisation cellulaire décrite récemment dans l'évolution et implique un nombre croissant de protéines membranaires : RIP pour Regulated Intramembrane Proteolysis (Brown MS., et al., 2000, Rawson RB, 2002, Selkoe D., Kopan R., 2003). Le RIP est un évènement protéolytique hautement régulé dans lequel une protéine membranaire va subir deux clivages protéolytiques dans son domaine extracellulaire puis dans son domaine transmembranaire aboutissant à une protéine soluble intracellulaire (Brown MS., et al., 2000, Rawson RB, 2002, Selkoe D., Kopan R., 2003). Ainsi le mécanisme d'activation des récepteurs NOTCH consiste en une cellule voisine qui va exprimer à la surface un ligand appartenant soit à la famille Delta ou soit à la famille Jagged. Une fois que le ligand se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur NOTCH, cela va conduire à deux clivages

protéolytiques successifs, le premier médié par une métalloprotéase comme la protéine ADAM10 (A desintegrin and metalloprotease 10) et le second médié par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (GS). Ce dernier va entraîner le clivage de la partie intracellulaire du récepteur Notch (ICN) et donc sa libération dans le cytoplasme. L'ICN va par la suite, être transloquée dans le noyau où l'ICN va agir comme un coactivateur transcriptionnel. L'ICN se lie au complexe CSL/RBP-J pour ensuite recruter des coactivateurs tels que MAML1 (Mastermind-like 1) et l'histone acétyltransférase p300 qui vont donc conduire à l'activation de la transcription de ses gènes cibles (Kopan R et al., 2009, Oswald F et al., 2001). La protéine Notch possède une région régulatrice ; le domaine PEST (proline-glutamate-sérine-thréonine-rich) qui se situe en C-terminal. Ce domaine va être phosphorylé, ce qui va permettre la reconnaissance de ce dégron par les ubiquitines ligases, entraînant ainsi une dégradation du ICN par le protéasome (Gordon WR et al., 2008). Le mécanisme de cette voie de signalisation est illustré dans la figure 8b.

## 2. La voie de signalisation NOTCH dans la lymphopoïèse normale

### 2.1. La voie NOTCH1 dans la différenciation des LT :

La migration des CLP dans le thymus va permettre la maturation des LT comme précédemment mentionné (cf partie Lymphopoïèse T). Les cellules « stromales » du thymus expriment à leur surface les ligands Dll4 qui vont par la suite interagir avec les récepteurs transmembranaires Notch présents à la surface des cellules ETP.

De nombreuses études ont montré que la voie de signalisation NOTCH1 a un rôle dans la différenciation du lignage T au détriment du lignage B et du lignage myéloïde. Des travaux effectués sur la souris ont démontré que la délétion du gène *Notch1* (*Notch1*<sup>-/-</sup>) dans des souris de 4 semaines entraîne un blocage dans le développement des LT et donc une diminution conséquente de la fréquence des LT immatures (DN2 et DN3) et des LT matures (Radtke et al., 1999, Pear, WS et Radtke, 2003). Des expériences de

gain-de-fonction ont également été réalisées et confirment ces résultats obtenus (Pui, JC et al., 1999) (Figure 9c).

Durant la différenciation des LT, le clivage de NOTCH1 induit l'expression des gènes conduisant à la répression de la différenciation des cellules non-T (Garcia-Peydro et al., 2006), la production de la chaîne  $\alpha$  invariante du pré-TCR (Reizis et al., 2002) et favorise également la survie des DN3 dans la sélection  $\beta$  (Ciofani et al., 2005). *NOTCH1* participe à l'engagement vers la lignée CD4 ou CD8 ainsi qu'à la maturation et à la survie des simples positifs (SP) CD4 ou CD8. Il a été montré chez des souris délétées pour *Notch1*, que l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 contrôle le réarrangement VDJ $\beta$  et participe également à l'apoptose des cellules DN3 défectueuses (Wolfer et al., 2002). D'autres travaux ont également montré que l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 influence le lignage  $\alpha\beta$  T au détriment du lignage  $\gamma\delta$  T (Washburn T et al., 1997, Pear WS et Radtke, 2003). Chez l'humain, il a également été montré que l'association de la voie de signalisation NOTCH1 avec celle induite par Il-7R (décrite ultérieurement) conduit à la prolifération et à l'engagement des progéniteurs thymiques vers le lignage T (Garcia-Peydro et al., 2006). Par la suite, *Notch1* est réprimé plus tardivement par la signalisation du pré-TCR pour permettre le bon fonctionnement de la différenciation T (Yashiro-Ohtani Y et al., 2009).

Comme mentionné précédemment, Notch1 est requis dans la différenciation des LT (Pui et al., 1999, Radtke et al., 1999, Sambandam et al., 2005). Des études ont montré que l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 via l'ICN1 active le FT TCF-1 appartenant à la famille des HMG Box (Taghon TN et al., 2005). Des travaux sur des greffes en compétition de progéniteurs issues des souris déficientes pour le gène TCF-1 (*Tcf-1*<sup>-/-</sup>) et de souris contrôles présentent une reconstitution altérée du lignage T avec une diminution significative des ETP et une absence des DN2, DN3, DP et CD4. L'expression ectopique de *Tcf-1* dans ces progéniteurs lymphocytaires LMPP restaure la différenciation T, puis la signalisation induite par la voie de signalisation NOTCH initie l'expression de *Tcf-1* qui s'auto-régule positivement par la suite, et permet

l'expression de gènes de la différenciation T indépendamment de Notch1 comme les FT Gata-3 et Bcl11b, ou encore les composants de la signalisation du pré-TCR : CD3 $\gamma$ , Lat ou Lck. Ainsi TCF-1 est essentiel à la spécification et à la différenciation du lignage T (Weber et al., 2011).

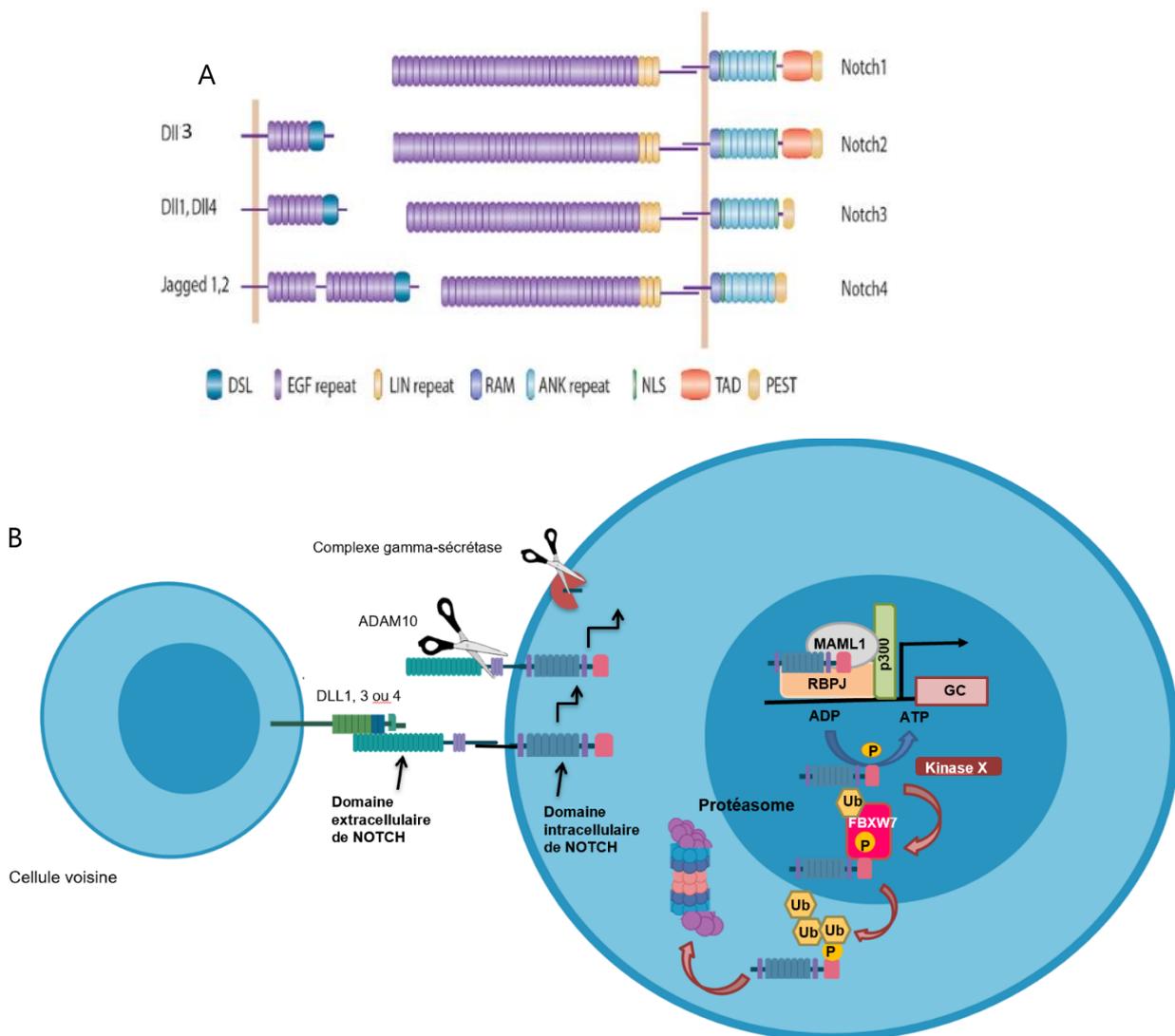
Le rôle de l'activation et du maintien de l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 sont résumés dans la figure 9.

Une autre étude a permis de mettre en évidence que la voie de signalisation Notch1 est requise pour la maturation et la différenciation des LT dans le système digestif au niveau des cryptopatches. Les cryptopatches (CP) intestinaux sont des structures composées de tissus lymphoïdes se situant à la base de la lamina propria (Saito H et al., 1998 et Wilson A., et al., 2000). Cependant, chez les souris knockout pour le gène *Notch1*, les souris ne présentent aucun développement ectopique de LB. Ces résultats suggèrent que le microenvironnement digestif n'est pas permissif pour le développement des LB (Saito H et al., 1998). Ce knockout conditionnel n'affecte pas le nombre de CLP dans les cryptopatches contrairement au CLP du thymus (Wilson A et al., 2000).

## 2.2. La voie NOTCH2 dans la différenciation des MzB

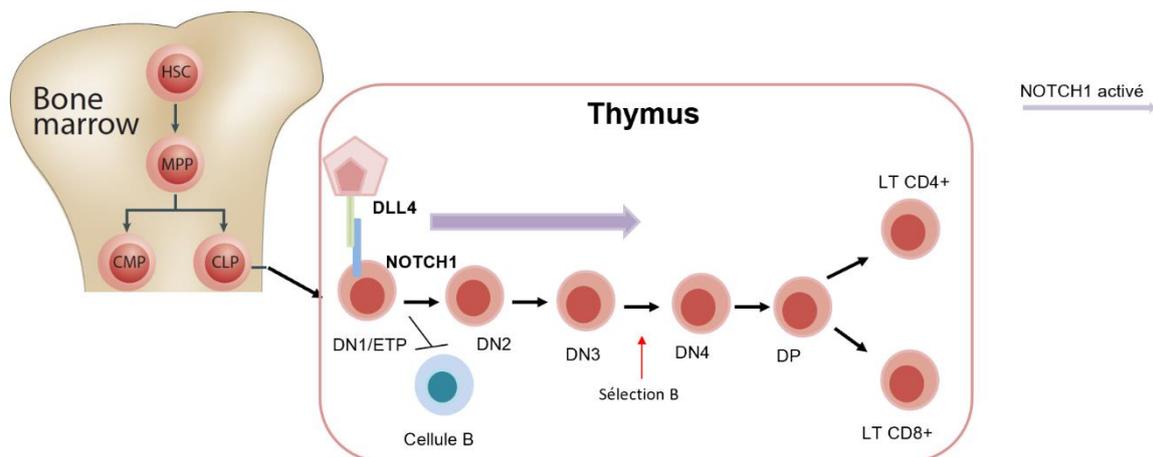
Des travaux effectués sur des souris invalidées pour *Notch2* (*Notch2*<sup>-/-</sup>) ont montré qu'il y avait une déplétion totale de cellules MzB. Ainsi, ces données démontrent que NOTCH2 est requis pour la différenciation et la maturation des cellules B immatures en cellules MzB dans la rate (Saito et al., 2003). D'autres travaux basés sur des expériences génétiques sur la souris (knockout conditionnel) sur *Rbpj*, *Mam11* et le ligand Dll1 ont également mis en évidence que ces trois éléments indispensables à l'activation de la voie de NOTCH2 sont essentiels à la maturation et au développement des cellules MzB (Tanigaki K et al., 2002, Wu L., et al., 2007, Oyama T. et al., 2006 et Hozumi K et al., 2004). Dans la zone marginale de la rate ainsi qu'au niveau des veinules de la pulpe

rouge, des cellules expriment le ligand DLL1. Le ligand DLL1 est requis dans l'activation de *NOTCH2* permettant le développement des MzB (Tan JB et al., 2009) (Figure 9). Ainsi, ces différentes études démontrent que le développement et la différenciation des MzB sont régulés par l'activation de la voie NOTCH2 en réponse à une liaison avec le ligand Dll1. La figure 10a résume l'implication de la voie de signalisation NOTCH2 dans la maturation des LB immatures vers les MzB. De plus, des études ont montré que le signal faible du BCR est aussi une des caractéristiques permettant une différenciation en faveur des MzB (Figure 10B-C) (Wen L., et al., 2005).



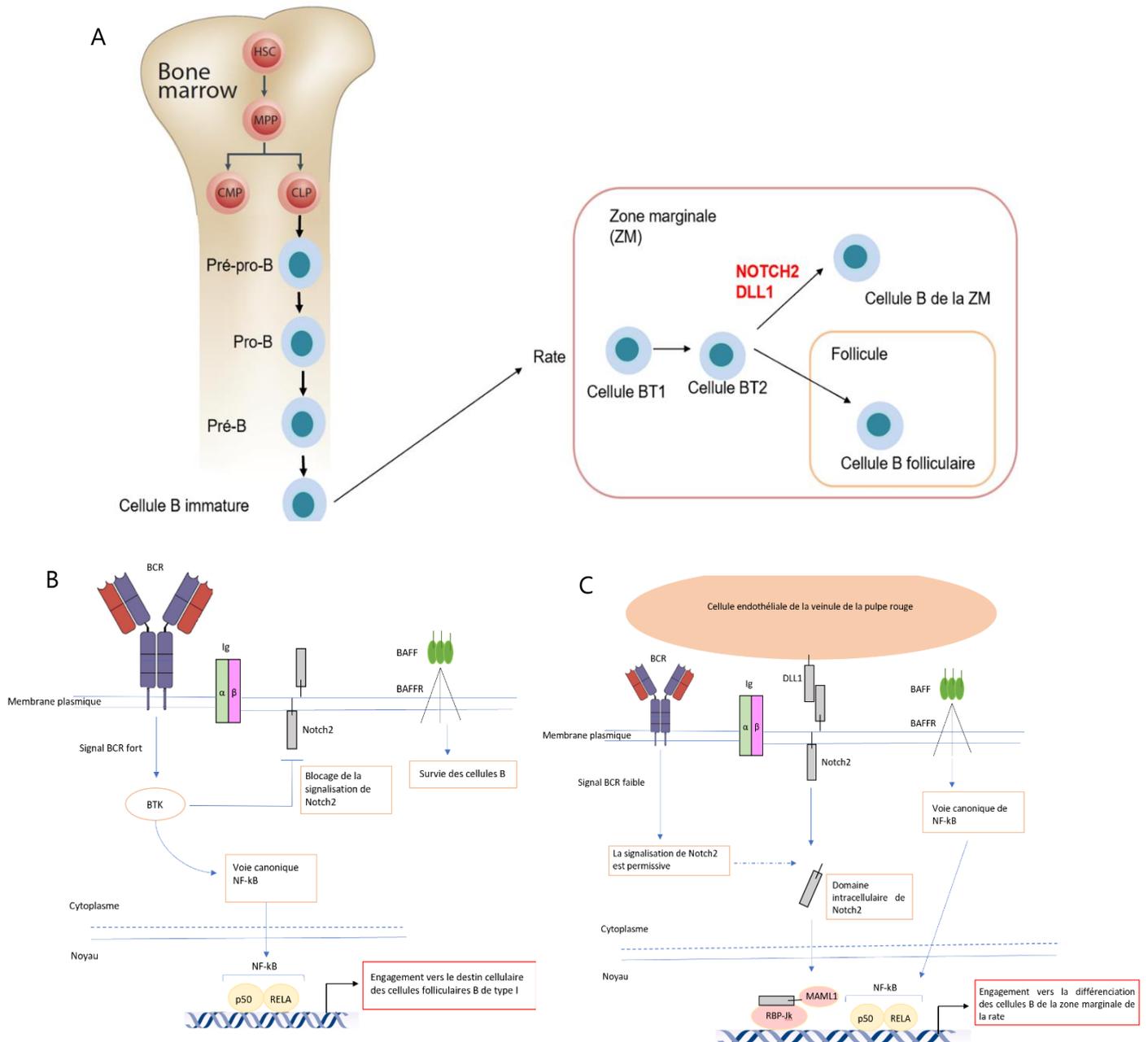
## Figure 8 : La voie de signalisation NOTCH

(A) Schéma représentant les structures des 4 récepteurs NOTCH chez l'humain ainsi que les 5 ligands Jagged 1 et 2 et Delta (DII) 1, 2 et 3. DSL : Delta-Serrate-LAG-2 (la partie se fixant à la partie extracellulaire du récepteur Notch), EGF repeat (Epidermal Growth Factor), LIN repeat : Lin-12/Notch séquence répétée en tandem, RAM : RBP-Jkappa-associated module, permet de médier l'interaction de l'ICN et du CSL/RBPJ, ANK repeat : Ankyrin repeat requis pour la transactivation de CSL/RBPJ, NLS : signal de localisation nucléaire, TAD : domaine de transactivation et PEST : proline-glutamate-sérine-thréonine-riche, comme précédemment mentionné, ce domaine permet la dégradation de l'ICN et donc l'arrêt de l'activité de Notch. (B) Schéma illustrant le mécanisme de la voie de signalisation NOTCH, une cellule voisine exprime un ligand soit de la famille Jagged ou DLL, celui-ci va interagir avec la partie extracellulaire du récepteur Notch déclenchant ainsi les deux clivages protéolytiques successifs permettant le relargage de la partie intracellulaire de Notch (ICN). L'ICN va par la suite se transloquer dans le noyau et recruter des coactivateurs tels que MAML1 et p300 pour permettre la transcription de ses gènes cibles. Cette activité est ensuite arrêtée par la reconnaissance de la phosphorylation du domaine PEST et polyubiquitinylation d'ICN par l'E3 ubiquitine ligase Fbw7 (F-box/WD) et sa dégradation par le protéasome



## Figure 9 : Schéma de l'implication de l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 dans la différenciation des LT

(a) Développement des LT dans le thymus. Les CSH donnant naissance à des CLP qui vont par la suite migrer dans le thymus où ils vont soit se différencier en LT au détriment de la différenciation des LB ou des cellules myéloïdes. via l'activation de la voie de NOTCH1 en réponse à sa liaison avec le ligand DII4 exprimé à la surface d'une cellule stromale thymique. La voie de signalisation NOTCH1 est activé entre la transition DN1 et DN2 et maintenu jusqu'à la transition DN3 et DN4. Le maintien de l'activation de la voie NOTCH1 est illustré par la flèche violette. Schéma adapté de la revue Radtke et al., 2013.



**Figure 10 : La maturation des LB dans la rate Schéma illustrant les signaux requis pour le destin cellulaire des cellules B immatures dans la rate**

Les CSH se spécifient en CLP avec des FTs communs impliqués dans la différenciation lymphoïde. A partir des CLPs, cela peut se différencier soit en LT à partir de FTs spécifiques à la lymphopoïèse T dans le thymus ou soit en LB à partir de FTs spécifiques à la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse. Les cellules B immatures migrent dans la rate. Les LB immatures vont être spécifiés en cellules B transitoires 1 et 2 (BT1, BT2). Selon l'intensité des signaux BCR et l'activation des voies NOTCH2 ou NF-κB, les cellules BT2 peuvent se différencier en cellules B folliculaires ou en cellules MzB. (B) Lors de la différenciation en du FoB. Un signal fort du récepteur BCR active la tyrosine kinase Btk qui va à son tour activer la voie NF-κB, ce qui peut empêcher les cellules à répondre aux signaux de NOTCH2. (C)

Lors de la différenciation en MzB. Le signal du BCR est faible. L'interaction du ligand DLL1 exprimé ici par une cellule endothéliale de la pulpe rouge avec le récepteur Notch2. L'activation de la voie de signalisation de NOTCH2 va permettre la maturation des LB immatures en MzB. Ici, les signaux dû à l'interaction de BAFF avec son récepteur va activer la voie NF-κB permettant la prolifération des MzB

### 3. La voie de signalisation NOTCH dans les hémopathies

Les hémopathies sont définies comme l'ensemble des maladies affectant les cellules du sang. Elle peuvent être divisées en 3 grands groupes :

- Les syndromes dits « prolifératifs » (*i.e.* lymphome et syndrome myéloprolifératif) sont définis par une accumulation anormale de cellules matures.
- Les syndromes dits « dysplasiques » (*i.e.* syndrome myélodysplasique) sont définis par une altération de la différenciation et un défaut en cellules hématopoïétiques matures.
- Les leucémies aiguës sont caractérisées par une prolifération accrue de progéniteurs immatures combinée à un blocage de la différenciation.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (ou WHO « World Health Organization ») met à jour régulièrement une classification internationale prenant en compte le tissu d'origine (myéloïde et lymphoïde), les données morphologiques et immunophénotypiques et les données génétiques et moléculaires. Les hémopathies du tissu lymphoïde sont classées selon leurs types cellulaires : B, T et NK. Dans cette classification, il existe deux principales classifications : les lymphomes de type Hodgkiniens et les lymphomes de type non-Hodgkiniens (NH).

Les pathologies lymphoïdes B et T se divisent en deux groupes : les leucémies aiguës (LA) et les proliférations lymphoïdes matures incluant également les lymphomes cutanés. Les LA sont caractérisées par la prolifération anormales de cellules blastiques en premier lieu dans la MO. Ces cellules peuvent par la suite passer dans le sang et coloniser d'autres organes par dissémination. Cette prolifération anarchique dérégule

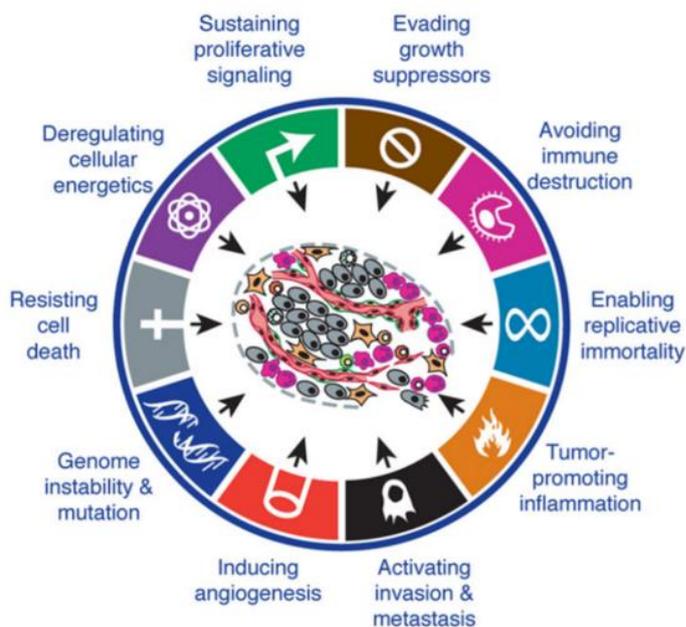
l'hématopoïèse normale et se traduit par une diminution de l'ensemble des cellules du sang : des globules rouges (anémie, hémoglobine (Hb) < 7g/dL), des globules blancs (cytopénie < 1G/L) et des plaquettes (thrombopénie < 0.5 G/L). Ces anomalies étant détectées par numération sanguine. Un immunophénotypage et une observation cytologique sur frottis de sang ou de moelle sont nécessaires pour déterminer et classer le type de leucémie.

Des altérations génétiques et génomiques sont à l'origine de la pathogenèse. Il existe trois grands types d'altérations génétiques : les altérations chromosomiques de structure, de nombre et les mutations ponctuelles. Au niveau fonctionnel, ces altérations peuvent avoir des conséquences variées et affecter deux grands types de gènes : les oncogènes, dont l'expression confère un avantage sélectif aux cellules (mutations gains de fonction, surexpression) et les gènes suppresseurs de tumeurs, affectés par des mutations pertes de fonction ou sous-expression (Revue Croce 2008). Des études récentes ont permis de montrer que selon le contexte cellulaire dans des modèles spécifiques, des altérations génétiques d'un même gène peuvent avoir un rôle oncogénique et tumeur suppresseur comme NOTCH. Lorsqu'une altération est à l'origine d'une transformation, on définit cela comme une mutation « driver » en anglais. Ces mutations peuvent conférer dans certains cas, un avantage sélectif. A l'opposé, la mutation dit « passager », ne participe pas au développement de la pathologie (Revue Pon et al., 2015). Les altérations génétiques peuvent affecter les gènes codant pour des FTs, des régulateurs chromatinien, des facteurs d'épissage, les effecteurs du cycle cellulaire et des voies de signalisation et modifient les grandes fonctions cellulaires. Tout cela est résumé dans la figure 11. Les caractéristiques les plus communément retrouvées sont :

- L'instabilité génomique
- L'immortalité réplivative
- Une prolifération anarchique
- La dérégulation du métabolisme énergétique

- L'échappement aux suppresseurs de croissance
- L'échappement au système immunitaire
- L'échappement à la mort cellulaire

Les cellules cancéreuses sont également capables d'induire une inflammation de leur microenvironnement et une néo-angiogenèse pour envahir l'organisme par le biais des métastases dans le cas des cancers solides (Revue Hanahan et al., 2011).



**Figure 11 : Principales caractéristiques des cellules cancéreuses.**

Figure issue de la revue Hanahan et al., 2011.

Dans ce chapitre, je vais décrire les principales hémopathies où la voie de signalisation NOTCH est mutée dans la majorité des cas.

### 3.1. La voie de signalisation NOTCH1 dans les leucémies T aiguës (LAL-T)

Le LAL-T sont caractérisées par une accumulation de cellules T immatures. Les cellules tumorales T expriment des marqueurs T immatures. Ces cellules T immatures se diffusent par infiltration au niveau de la MO. Les LAL-T représentent 10 à 15% de LAL pédiatrique et 20 à 25% de LAL adulte en Europe (Hunger S et al., 2015, Litzow et al., 2015). La LAL-T affecte deux fois plus les hommes que les femmes (Goldberg JM et al.,

2003). Les LAL sont les cancers pédiatriques les plus fréquents et la cause de décès lié à un cancer chez les patients de moins de 20 ans (Smith MA et al., 2010). Les patients des LAL-T manifestent un taux élevé de leucocytes, une cytopénie de neutrophiles, une anémie et une thrombocytopénie. Certains patients présentent une masse thymique avec une infiltration limitée de la MO.

La LAL-T comme les autres types de cancer, est le résultat d'un ensemble de processus de transformations dans lequel une accumulation d'altérations génétiques aboutit à un dysfonctionnement de l'expression des gènes oncogéniques clés et des gènes suppresseurs de tumeur. Les LAL-T sont caractérisés par des dysfonctionnements au niveau des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire, de la prolifération, de la survie et de la différenciation durant le développement des thymocytes. Les différentes altérations génétiques sont répertoriées dans le tableau 1. Il existe une interconnexion entre les régulateurs clés du développement de cellules T précoces et des signaux oncogéniques. Le meilleur exemple illustrant cette interconnexion est la mutation gain de fonction de NOTCH1 qui un facteur clé dans la spécification et le développement des cellules T. Cette mutation activatrice de NOTCH1 est retrouvée dans 60% des cas dans la LAL-T (Weng AP et al., 2004). Cette mutation est généralement associée à :

- Une perte de fonction de l'inhibiteur de la cycline dépendante de la kinase 2A (CDKN2A) qui code pour les gènes suppresseur de tumeur : p16<sup>INK4A</sup> et p14<sup>ARF</sup>
- Des réarrangements chromosomiques qui entraînent une transcription aberrante de gènes spécifiques au cellules T fonctionnant ainsi comme oncogènes.

La fréquence des mutations sont retrouvées dans le tableau 1

**Table 1. Mutation frequencies in adult vs pediatric T-ALL**

Gene	Type of genetic aberration	Frequency	
		Pediatric	Adult
<b>NOTCH1 signaling pathway</b>			
<i>FBXW7</i>	Inactivating mutations	14	14
<i>NOTCH1</i>	Chromosomal rearrangements/activating mutations	50	57
<b>Cell cycle</b>			
<i>CDKN2A</i>	9p21 deletion	61	55
<i>CDKN2B</i>	9p21 deletion	58	46
<i>RB1</i>	Deletions		12*
<b>Transcription factors</b>			
<i>BCL11B</i>	Inactivating mutations/deletions	10	9
<i>ETV6</i>	Inactivating mutations/deletions	8	14
<i>GATA3</i>	Inactivating mutations/deletions	5	3
<i>HOXA (CALM-AF10, MLL-ENL and SET-NUP214)</i>	Chromosomal rearrangements/inversions/expression	5	8
<i>LEF1</i>	Inactivating mutations/deletions	10	2
<i>LMO2</i>	Chromosomal rearrangements/deletions/expression	13	21
<i>MYB</i>	Chromosomal rearrangements/duplications	7	17
<i>NKX2.1/NKX2.2</i>	Chromosomal rearrangements/expression		8*
<i>RUNX1</i>	Inactivating mutations/deletions	8	10
<i>TAL1</i>	Chromosomal rearrangements/5' super-enhancer mutations/deletions/expression	30	34
<i>TLX1</i>	Chromosomal rearrangements/deletions/expression	8	20
<i>TLX3</i>	Chromosomal rearrangements/expression	19	9
<i>WT1</i>	Inactivating mutation/deletion	19	11
<b>Signaling</b>			
<i>AKT</i>	Activating mutations	2	2
<i>DNM2</i>	Inactivating mutations	13	13
<i>FLT3</i>	Activating mutations	6	4
<i>JAK1</i>	Activating mutations	5	7
<i>JAK3</i>	Activating mutations	8	12
<i>IL7R</i>	Activating mutations	10	12
<i>NF1</i>	Deletions	4	4
<i>KRAS</i>	Activating mutations	6	0
<i>NRAS</i>	Activating mutations	14	9
<i>NUP214-ABL1/ ABL1 gain</i>	Chromosomal rearrangement/duplication		8*
<i>PI3KCA</i>	Activating mutations	1	5
<i>PTEN</i>	Inactivating mutations/deletion	19	11
<i>PTPN2</i>	Inactivating mutations/deletion	3	7
<i>STAT5B</i>	Activating mutations	6	6
<b>Epigenetic factors</b>			
<i>DNMT3A</i>	Inactivating mutations	1	14
<i>EED</i>	Inactivating mutations/deletions	5	5
<i>EZH2</i>	Inactivating mutations/deletions	12	12
<i>KDM6A/UTX</i>	Inactivating mutations/deletions	6	7
<i>PHF6</i>	Inactivating mutations/deletions	19	30
<i>SUZ12</i>	Inactivating mutations/deletions	11	5
<b>Translation and RNA stability</b>			
<i>CNOT3</i>	Missense mutations	3	8
<i>mTOR</i>	Activating mutations		5*
<i>RPL5</i>	Inactivating mutations	2	2
<i>RPL10</i>	Missense mutations	8	1
<i>RPL22</i>	Inactivating mutations/deletion	4	0

### Tableau 1 : Fréquences des mutations entre les LAL-T adultes et les LAL-T pédiatriques

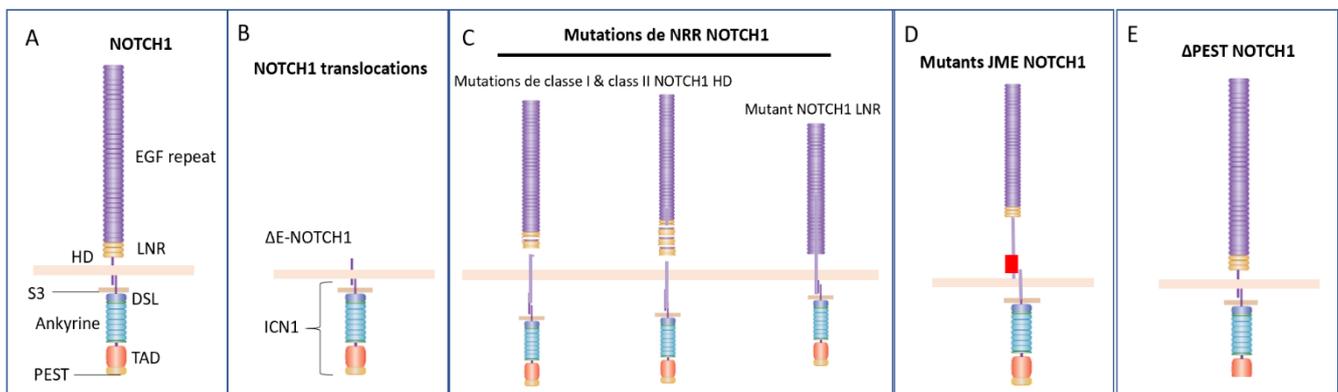
Tableau issu de la revue Girardi et al., 2017. Des approches génomiques par séquençage à haut débit du génome (de tout le génome, des exons et du transcriptome) ont permis d'identifier plus de 100 gènes mutés dans les LAL-T adulte et pédiatrique. Parmi, les gènes mutés identifiés, *NOTCH1* et *CDKN2A/2B* sont mutés dans plus de 50% des cas. Ici, sont donc représentés les fréquences de mutations dans les gènes identifiés dans les LAL-T adulte et pédiatrique.

Ainsi, la mutation principalement retrouvée chez les patients est la mutation au niveau de la voie de signalisation NOTCH1 qui est retrouvée aussi bien dans les LAL-T adulte que pédiatrique.

L'activation aberrante de la voie de signalisation NOTCH1 a été identifiée pour la première fois dans les rares cas de LAL-T. Dans ces LAL-T, la mutation retrouvée dans

1% des cas est une translocation chromosomique t(7;9)(q34;q34.3) qui entraîne par la suite l'expression d'une protéine tronquée induisant une forme constitutive de la protéine NOTCH1 (Ellisen LW et al., 1991). Cependant, dans la majorité des LAL-T, ce n'est pas une translocation chromosomique qui est retrouvée mais une mutation ponctuelle qui permet l'interruption spécifique de domaines responsables du contrôle de l'initiation et de la terminaison de la voie de signalisation NOTCH1 (Weng AP et al., 2004). Dans 8 à 30% des cas, des mutations au niveau d'une ubiquitine ligase, le F-box and WD repeat domain containing 7 (*FBXW7*) sont également observées. Cette mutation entraîne une altération de la dégradation de la forme active de NOTCH1 (ICN1) (O'Neil J et al., 2001, Thompson BJ et al., 2007). Le rôle oncogénique de *NOTCH1* dans les LAL-T a été étudié à l'aide de modèles murins pour lesquels les progéniteurs hématopoïétiques ont été infectés par des vecteurs rétroviraux contenant la forme active de NOTCH1 induisant une activation constitutive (Pear WS et al., 1996). Dans ces modèles murins, une forte expression de la forme mutante de NOTCH1 peut induire une LAL-T. Certaines formes de mutations de NOTCH1 telles que les mutants du domaine d'hétéro-dimérisation de *NOTCH1* (HD) ou le domaine mutant PEST peuvent également induire une LAL-T avec une coopération de différents facteurs oncogéniques comme *Kras*<sup>G12D</sup> (Chiang MY et al., 2008). Les formes oncogéniques de NOTCH1 dans les LAL-T sont résumées dans la figure 21. Par la suite, de nombreuses études ont permis de caractériser les voies de signalisations contrôlées par l'activation de NOTCH1 dans les LAL-T. Pour cela, des chercheurs ont identifié les gènes cibles directs de *NOTCH1*. Ainsi, les gènes cibles directs identifiés dans les voies de signalisation anabolique incluent la biosynthèse des ribosomes, les protéines impliquées dans les processus de traduction protéique et dans le métabolisme des nucléotides et des acides aminés (Palomero T et al., 2006, Weng AP et al., 2006). De plus, des études génomiques faites sur *NOTCH1* ont mis en évidence des sites de fixation à l'ADN qui jouent un rôle dynamique dans la régulation des gènes cibles de *NOTCH1* via les super-enhancers (Wang H et al., 2014). Les effets sur la croissance

cellulaire induit par le programme transcriptionnel de *NOTCH1* sont amplifiés par l'augmentation de l'expression de l'oncogène *MYC* qui a été identifié comme étant le gène cible direct de *NOTCH1* (Palomero T et al., 2006, Herranz D et al., 2014, Yashiro-Ohtani Y et al., 2014). Un autre gène direct de NOTCH conservé entre les espèce ; *HES1* (« Hairy and enhancer of split 1 ») joue également un rôle dans la pathogenèse. *HES1* est impliqué dans l'activation des voies PI3K et de NF-κB en aval de la voie de signalisation NOTCH. *HES1* est également impliqué dans la régulation inhibitrice des récepteurs glucocorticoïdes et dans la suppression de l'apoptose via la diminution de l'expression de *BCL-2* (gène pro-apoptotique) (Wendorff et al., 2010). De plus, de récentes études sur le transcriptome de *NOTCH1* dans les LAL-T ont mis en évidence la régulation des ARN longs non codants (lncRNAs) par *NOTCH1* dans les LAL-T. Parmi les lncRNAs, Les lncRNAs de *IGF1R* (« Insulin-like growth factor 1 receptor ») et *LUNAR1* sont requis dans la croissance tumorale dans les LAL-T (Trimarchi T al., 2014, Revue : Belver L & Ferrando A 2016) (Figure 12).



**Figure 12 : Illustration des formes oncogéniques de NOTCH1 dans les LAL-T.**

(A) Condition où le récepteur NOTCH1 n'est pas activé par liaison à son ligand (ici DLL4). (B) Translocations chromosomiques impliquant NOTCH1 et le locus du récepteur TCR induisant l'expression des formes tronquées de NOTCH1 ( $\Delta E$ -NOTCH1). La protéine  $\Delta E$ -NOTCH1 localisée à la membrane mais possède une forme constitutivement active de ICN1 grâce au complexe GS. (C) Les mutations de NOTCH1 impliquant le domaine régulateur négatif (NRR) qui entoure le domaine HD et le LIN12-NOTCH (LNR). Ce domaine NRR qui, en condition basale, entraîne un verrouillage intramolécule responsable du maintien du récepteur NOTCH1 dans la configuration inactif. Les

mutations des domaines NRR, HD et de LNR entraînent une induction de l'activation de NOTCH1 en déplaçant le site de clivage de la désintégrine S2 et l'ADAM10 en dehors du complexe HD-LNR. (D) Les mutations au niveau des allèles de l'expansion de la juxtamembrane de NOTCH1 (JME) entraîne une mutation activatrice dû à des insertions en phase de nucléotides permettant ainsi l'augmentation de la séparation du complexe HD-LNR de la membrane. (E) Cette mutation entraîne la formation d'une protéine tronquée au niveau du domaine PEST en C-terminal ( $\Delta$ PEST), ce qui va perturber la reconnaissance de FBXW7 impactant ainsi la dégradation de l'ICN1 par le protéasome. En rouge sont représentés les séquences altérées de NOTCH1 dans les différentes mutations représentées.

Les traitements utilisés actuellement sont des combinaisons de plusieurs chimiothérapies à hautes doses. Ces combinaisons présentent un bon taux de survie pour les patients pédiatriques (Hunger SP et al., 2012). Cependant, ces traitements présentent des effets secondaires à court et long-terme au niveau du système nerveux central et de la fertilité (den Hoed MA et al., 2015). De plus, de nombreuses rechutes sont également observées chez les patients adultes et enfants, respectivement 40% et 20%. L'utilisation du séquençage du génome a permis l'identification des mutations activatrices responsable des rechutes dans les 5'-nucléotidase II cytosolique (NT5C2). La NT5C2 est une enzyme responsable de l'inactivation de certaines chimiothérapies à base d'analogues nucléosidiques (Tzoneva G et al., 2013, Kunz JB et al., 2015 et Brouwer C et al., 2005). Ainsi, plusieurs approches de traitement des LAL-T ont été établies afin de permettre de réduire les rechutes et la toxicité des traitements déjà utilisées en association avec des nouveaux agents. Les différents traitements en cours d'essai clinique sont résumés dans le tableau 2. *NOTCH1* est une cible potentielle dans la thérapie des LAL-T notamment de nombreux inhibiteurs du complexe  $\gamma$ -sécrétase (GSI) sont en cours d'essai clinique. Cependant, l'utilisation de GSI lors des essais cliniques aboutissent à des mauvais résultats, du fait de la toxicité engendrée, notamment au niveau du système digestif (Papayannidis C et al., 2015, Zweidler-McKay P et al., 2014, Messersmith WA et al., 2015 et Knoechel B et al., 2015). Pour pallier l'utilisation des GSI, d'autres traitements sont également testés tels que les anticorps bloquants monoclonaux contre NOTCH1 qui présentent une toxicité gastrique moindre (Aste-Amézaga M et al., 2010 et Wu Y et al., 2010). Des inhibiteurs d'ADAM10, les anticorps

anti-  $\gamma$ -sécrétase (A5226A) et des analogues peptidiques qui rentrent en compétition avec MAML1 dans l'interaction de NOTCH1 sur ADN (SAMH1) sont également testés (Sulis ML et al., 2011, Moellering RE et al., 2009 et revue : Girardi et al., 2017).

Les GSI engendrent des effets indésirables sévères dû à une forte toxicité au niveau du système digestif. De plus des études ont mis en évidence que lorsque les GSI sont administrés à des doses classiquement supportables, cela entraîne une faible efficacité au niveau de la survie des cellules tumorales (Papayannidis C et al., 2015, Zweidler-McKay P et al., 2014, Messersmith WA et al., 2015 et Knoechel B et al., 2015). Il a été également montré que les GSI peuvent avoir d'autres substrats (APP, E-Cadherine, N-Cadherine, ErbB4) que les récepteurs NOTCH pouvant ainsi entraîner d'autres effets indésirables (Haapasalo A., and Kovacs DM., 2012).

Compound	Specificity	Clinical phase	Disease
<b>NOTCH1 signaling</b>			
MK-0752	GSI	Phase 1	T-ALL and lymphoma
PF-03084014	GSI	Phase 1	Advanced-stage cancers, T-ALL, lymphoblastic lymphoma
BMS-906024 (with dexamethasone)	GSI	Phase 1	T-ALL or T-cell lymphoblastic lymphoma
OMP-52M51	Notch1 inhibitory antibody	Phase 1	Dose-escalation study in lymphoid malignancy
LY3039478	Notch1 inhibitor	Phase 1	Dose-escalation study in advanced-stage cancers
BMS-536924	ATP-competitive IGF-1R/IR inhibitor	Preclinical	

**Tableau 2 : Les traitements utilisés contre NOTCH1 dans les LAL-T et leurs stades de tests cliniques.**

Tableau adapté de la revue Girardi et al., 2017. Ce tableau représente les différents inhibiteurs de la voie NOTCH1 utilisés dans les LAL-T ainsi que les différents stades de tests cliniques. (T-ALL : LAL-T, GSI : inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, compound : composant, specificity : spécificité, clinical phase : phase clinique et disease : maladie).

D'autres traitements en combinaison de ces inhibiteurs de NOTCH1 sont également utilisés contre les différentes mutations associées tels que :

- Les inhibiteurs de JAK/STAT (ruxolitinib et tofacitinib)
- Les inhibiteurs de gènes anti-apoptotiques (ABT263 et ABT-199)
- Les inhibiteurs de la voie PI3K (CAL-130), des inhibiteurs de MEK (Selumetinib)
- Les inhibiteurs d'ABL (imatinib, dasatinib)
- Les inhibiteurs de la voie Hedgehog
- Les inhibiteurs de traduction (Rapamycin, 4EGI-1)

### 3.2. La voie de signalisation NOTCH dans les lymphomes B

Plusieurs études ont identifié des mutations au niveau de la voie de signalisation NOTCH dans les lymphomes B. Parmi les lymphomes B, une étude menée par l'équipe de Gascoyne RD (Kridel R., et al., 2012) a permis de mettre en évidence une mutation au niveau de *NOTCH1* dans les lymphomes B du manteau (MCL). Plus précisément, ils ont identifié que la majorité des mutations affectent le domaine PEST, indispensable à la dégradation de l'ICN-1. Les mutations au niveau de la voie de signalisation NOTCH1 est retrouvée dans 5 à 10% des cas, de manière récurrente et est généralement associée à un mauvais pronostic. Ils démontrent également que la voie de signalisation NOTCH1 est indispensable pour les signaux de survie dans les lignées MCL. Une autre étude a permis d'identifier des gènes cibles directs de la voie de signalisation NOTCH1 de manière *in vitro* et *in vivo*. Parmi les gènes cibles directs, nous notons l'oncogène *MYC*, les gènes impliqués dans la signalisation du récepteur BCR et de la signalisation des cytokines (Ryan RJ., et al., 2017).

### **Chapitre 3 : La voie de signalisation NOTCH dans les lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL)**

L'OMS a classifié trois différentes entités clinico-pathologiques dans la catégories des lymphomes de la zone marginale (LZM) :

- Le lymphome B de la zone marginale ganglionnaire (NMZL, de : « Nodal Marginal Zone Lymphoma)
- Le lymphome B de la zone marginale du tissu lymphoïdes associé aux muqueuses (MALT, de l'anglais : « Mucosa-associated Lymphoid Tissue ») ou lymphome extra-ganglionnaire
- Le lymphome B de la zone marginale de la rate (SMZL, de l'anglais : « Splenic Marginal Zone Lymphoma »)

Ces trois types de lymphomes partagent la même origine : les cellules de la zone marginale mais d'un point de vue clinique et moléculaire, ils sont tous trois distincts (Swerdlow SH et al., 2012).

La zone marginale (ZM) est une structure très développée qui a été identifiée la première fois dans la rate. Il s'agit d'une entité lymphoïde possédant des noyaux réguliers avec un cytoplasme variable. Les cellules de la ZM de la rate expriment les marqueurs suivants : CD20+, CD79a+, IgM+, CD21+, phosphatase alcaline positive, CD23-, BCL6- et IgD-. La taille et l'immunophénotype de la ZM de la rate peuvent varier avec l'âge et dans des conditions pathologiques spécifiques (Falini B et al., 2003, Zandvoort A et al., 2001). La ZM de la rate joue un rôle important dans le transport de complexes immuns au niveau des follicules afin de les présenter à la surface des cellules folliculaires dendritiques (Spencer J et al., 2004). La ZM ganglionnaire présente les mêmes immunophénotype et topographie que celle de la rate (Camacho FI et al., 2001, Johrens K et al., 2005, Stein K et al., 1999 et van der Oord JJ et al., 1989).

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au lymphome B de la zone marginale de la rate (SMZL).

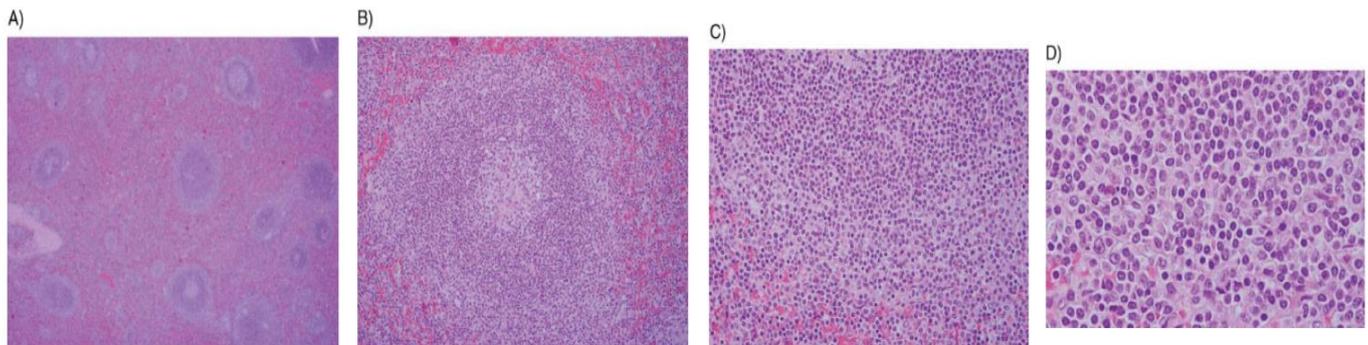
## 1. Données cliniques

Le lymphome B de la zone marginale de la rate (SMZL de l'anglais : « Splenic marginale zone lymphoma ») est un lymphome indolent et rare car il représente 1 à 2% des lymphomes NH. Il est caractérisé par un néoplasme de cellules B impliquant la rate, la MO et le sang. Ce type de lymphome a été décrit pour la première fois par l'équipe de Schmid en 1992. Les patients manifestent une lymphocytose dans les stades avancées, une splénomégalie et dans certains cas, une cytopénie. Dans 20% des cas, des manifestations auto-immunes sont retrouvées. Parmi ces manifestation auto-immunes, nous retrouvons :

- Une anémie hémolytique auto-immune
- Une thrombocytopénie immune
- Une maladie de l'agglutinine froide
- Un développement de la maladie de von Willebrand manifesté par la présence d'anticoagulant dans la circulation systémique
- Ou une angio-œdème dû à une déficience de l'inhibiteur de la C1-estérase.  
(Thieblemont C et al., 2002, Gebhart J et al., 2014, Castelli R et al., 2016).

Il est difficile de diagnostiquer ce type de lymphome du fait, de son indolence. Les patients ont généralement une survie médiane de 8 à 10 ans (Arcaini L et al., 2006, Oiszewski AJ et al., 2013). Les patients ayant des stades avancées peuvent subir dans 5 à 10% des cas, une transformation vers le développement de lymphome B à grandes cellules (DLBCL) (Camacho FI et al., 2001, Lenglet J et al., 2014, Conconi A et al., 2015). Le SMZL affecte principalement les adultes avec un âge médian à 69 ans. L'incidence est estimée à 0.13 pour 100 000 personnes par an. Les méthodes employées pour diagnostiquer ce type de lymphome sont des coupes histologiques via les biopsies et la morphologie de la MO et de la rate. La tumeur au niveau de la rate est souvent caractérisée par des micronodules lymphoïdes qui s'infiltrent de la pulpe blanche vers la pulpe rouge. Cette infiltration influe sur la différenciation des ZM et un

remplacement folliculaire par les cellules néoplasiques. La morphologie du SMZL avec une implication splénique est illustrée dans la figure 13.



**Figure 13 : Morphologie splénique caractéristique du SMZL.**

Figure issue de la revue Mollejo M et al., 2005. (A) Un patron caractéristique montrant les micronodules lymphoïdes centrés au niveau de la pulpe blanche avec une infiltration variable au niveau de la pulpe rouge. (B) Des nodules localisées dans les follicules préexistants. (C) Résidus de GC entourés par des composants internes tels que les petits lymphocytes, les composants des bordures de la ZM avec plusieurs blastes dispersés. (D) Composition cytologique au niveau de la rate d'un patient SMZL.

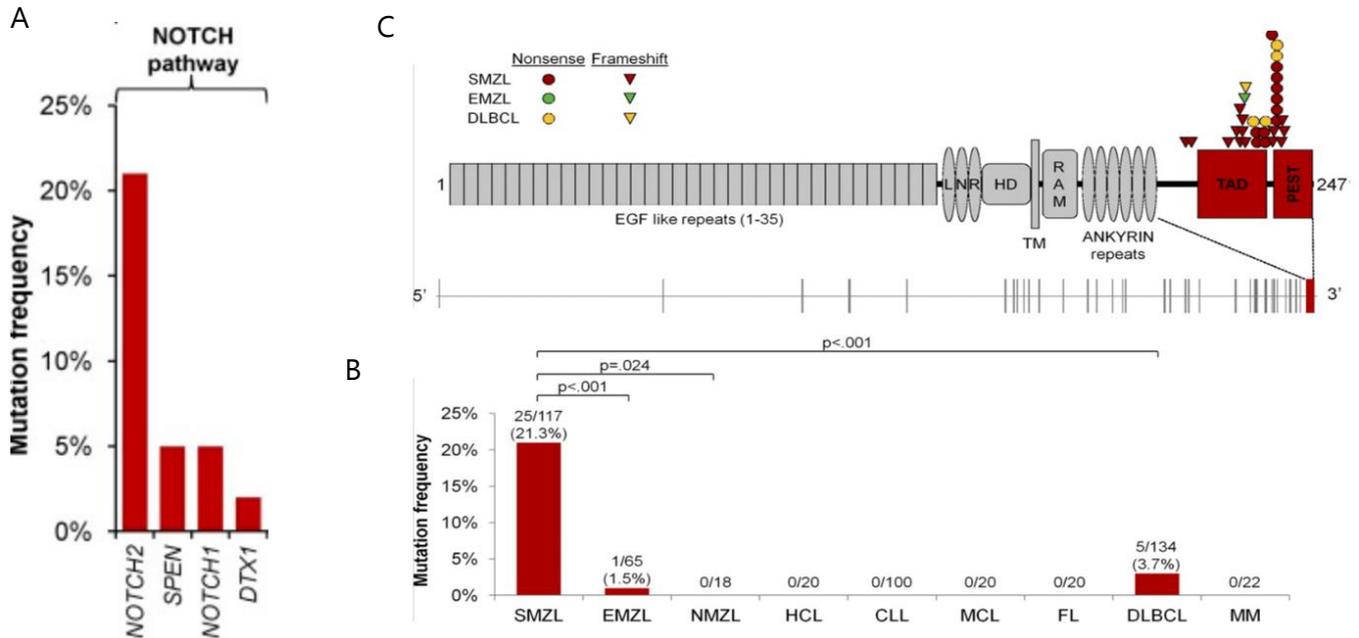
Au niveau cytologique, l'implication du sang est fréquente. La morphologie cytologique est caractérisée par des lymphocytes avec un noyau rond, une chromatine condensée et un cytoplasme basophile avec des villi polaires. Cette morphologie cellulaire est aussi appelée lymphocyte villeuse. Une hétérogénéité au niveau de la morphologie sanguine est observée par des degrés variables de cellules monocytoïdes et plasmacytoïdes. L'infiltration de la MO est caractérisée par des nodules inter-trabéculaires polymorphiques et par une infiltration interstitielle et intra-sinusoidale de lymphocytes de petites tailles (Matutes E et al., 2008). Les cellules tumorales expriment à la surface des IgM et IgD et sont CD20+, CD43-, IgD+, BCL2+, CD5-, CD23-, Cycline D1-, BCL6-, CD10-, DBA44+/- (Isacson, 1997, revue : Mollejo et al., 2005).

Dans certains cas, l'infection par le VHC peut également être un facteur du développement d'un sous-groupe de SMZL. Cependant le lien entre l'infection par le VHC et le développement d'un SMZL n'est, à ce jour, pas connu.

## 2. La voie de signalisation NOTCH dans les SMZL

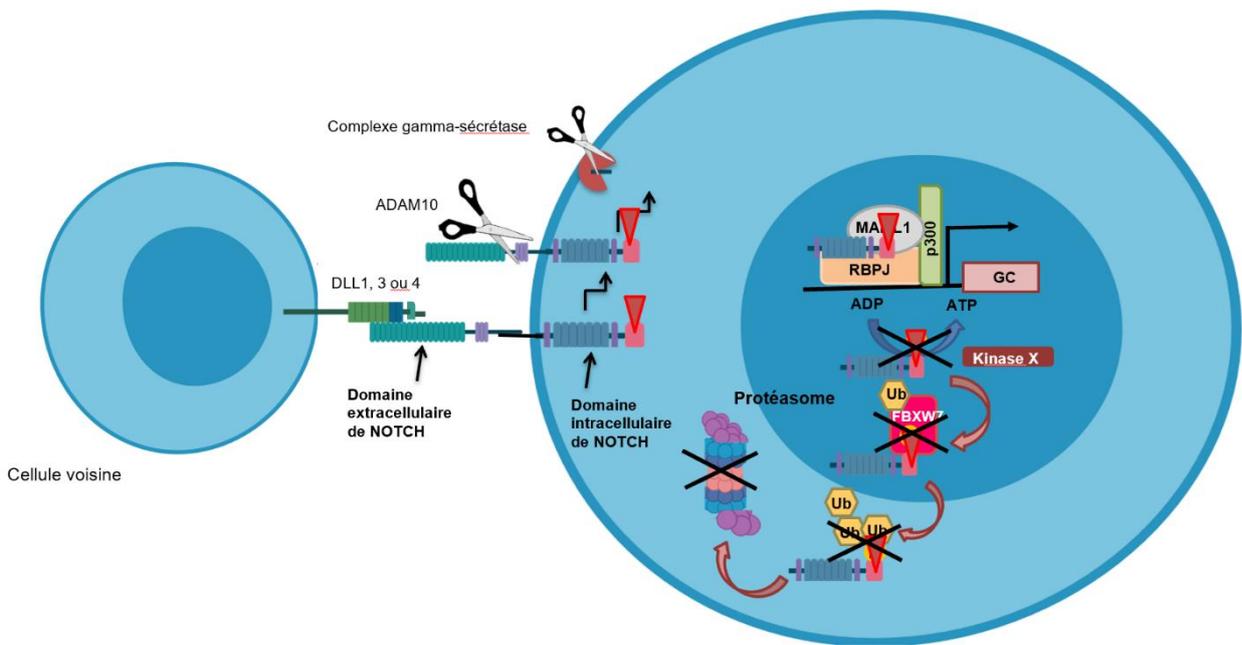
Des approches génomiques ont permis de mettre en évidence des mutations récurrentes et signatures chez les patients SMZL (Martinez N et al., 2014, revue Arcaini et al., 2017). Parmi ces gènes, nous retrouvons : des mutations au niveau de la voie de signalisation NOTCH. Le gène *NOTCH* ainsi que la transduction du signal qui suit son activation sont mutés de façon récurrente chez les patients SMZL dans 40% des cas. Dans ces 40% de mutations, 5% des mutations correspondent à des mutations au niveau du récepteur NOTCH1, 7% au niveau des régulateurs négatifs de la voie de signalisation NOTCH (SPEN et DTX1). De façon intéressante, nous notons que parmi les 40% de mutations de la voie de signalisation NOTCH retrouvées mutées chez les patients SMZL, 25% des mutations affectent le récepteur *NOTCH2* (Figure 14a). Cette voie de signalisation (décrite dans le chapitre 2) joue un rôle essentiel dans le développement et la différenciation des cellules MzB (Saito et al., 2003). Ainsi, la mutation de *NOTCH2* est donc la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients SMZL. La mutation récurrente et caractéristique retrouvée chez les patients SMZL est une mutation non-sens conduisant à un codon stop prématuré à la place de l'arginine en position 2400 (R2400\*) sur l'exon 34 (Figure 14b-c). Cette mutation somatique entraîne une troncation du domaine PEST au niveau C-terminal. Cette mutation entraîne une altération de la dégradation de l'ICN-2 (Figure 14c-15). Cette mutation somatique gain de fonction entraîne une augmentation de l'activité de *NOTCH2* dû fait d'une stabilisation de l'ICN-2. Des mutations au niveau du domaine de transactivation (TAD) sont retrouvées mais moins fréquemment que les mutations au niveau du domaine PEST (Figure 14c). La voie de signalisation *NOTCH2* est fréquemment mutée chez les patients SMZL comparée aux autres pathologies incluant d'autres types de lymphomes B et des myélomes (Figure 14b) (Rossi et al., 2012, Kiel MJ et al., 2012, Martinez et al., 2014, Peveling-Oberhag et al., 2015 et revue : Arcaini et al., 2017). Les patients ayant la mutation au niveau du gène *NOTCH2* sont associés à

des pronostics mauvais (Kiel MJ., et al., 2012). Les courbes de survies sont illustrées dans la figure 16.



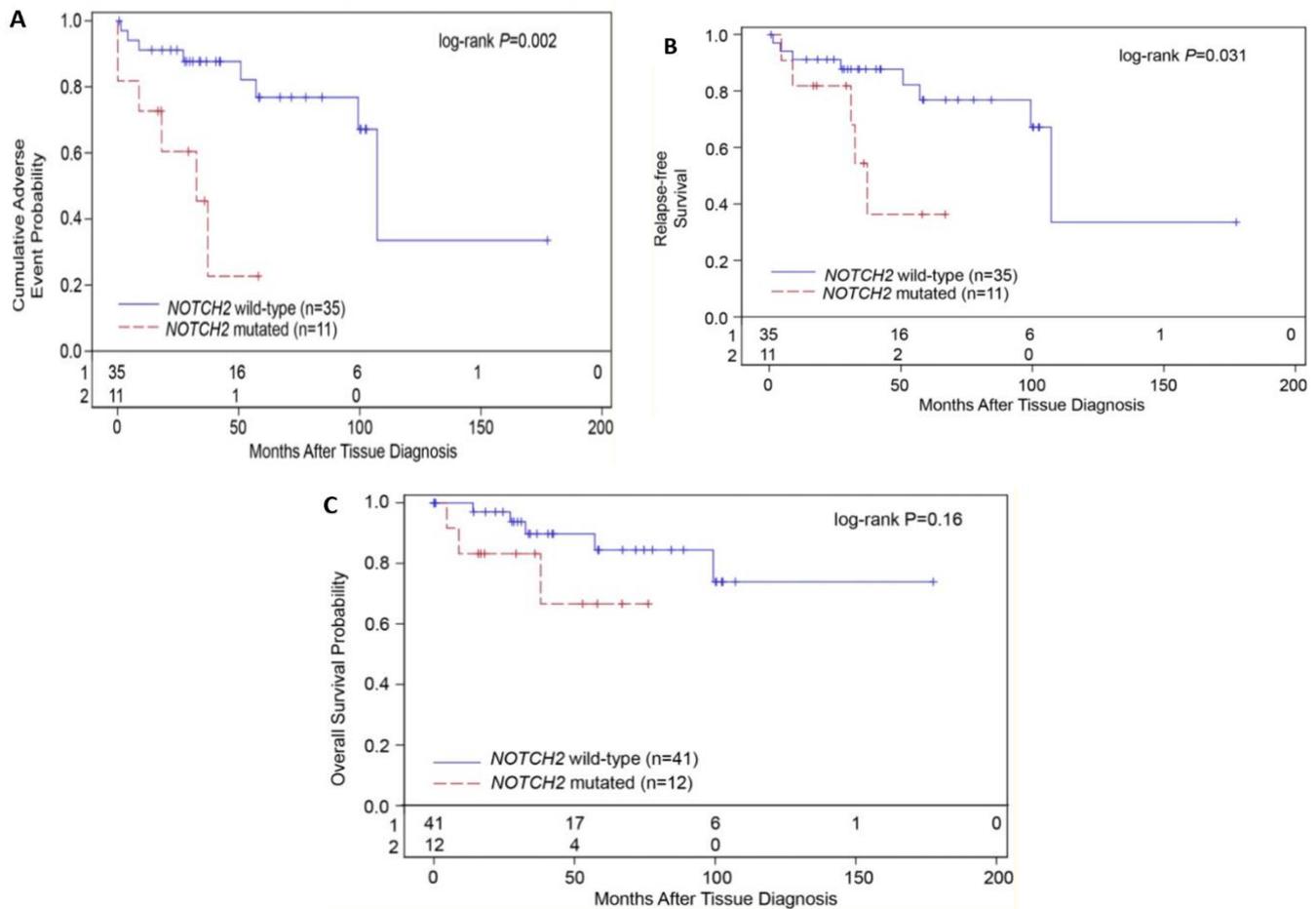
**Figure 14 : La voie de signalisation NOTCH mutée dans les SMZL.**

Représentation schématique de la voie de signalisation NOTCH altérée dans les SMZL. La prévalence de cette altération génétique dans les SMZL est montrée par les pourcentages à côté de la voie de signalisation. (A) Graphique représentant la fréquence des mutations retrouvée sur la cohorte de patients SMZL au niveau de la voie de signalisation NOTCH. (B) Graphique représentant la fréquence des mutations au niveau du récepteur NOTCH2 chez les patients SMZL comparée à d'autres sous-types de lymphomes B. (C) Schéma représentant l'ICN2 ainsi que les mutations hotspots chez les patients SMZL et d'autres sous-types de lymphomes B. NMZL : lymphome de la zone marginale ganglionnaires, HCL : leucémie à tricholeucocytes, CLL : leucémie lymphocytaire chronique, MCL : lymphome à cellules du manteau, FL : lymphome folliculaire, MM : myélome multiple.



**Figure 15 : Conséquence de la mutation gain-de-fonction de NOTCH2 retrouvée chez les patients SMZL.**

La mutation non-sens R240Q au niveau du domaine PEST de l'ICN2 entraîne une absence de phosphorylation et donc une absence de reconnaissance par les ubiquitines ligases. L'absence de reconnaissance par les ubiquitines ligases engendre une absence de polyubiquitination au niveau de la lysine 48 et donc une absence de dégradation de l'ICN2. Il y a donc un maintien de l'activation de la voie de signalisation NOTCH2 chez ces patients.



**Figure 16 : L'impact des mutation au niveau de la voie de NOTCH2 sur les conséquences cliniques des patients SMZL.**

Ces trois graphiques représentent des courbes de survies sont issues des travaux de Kiel MJ., et al., 2012 et représentent les conditions suivantes (A) : La probabilité des rechutes, de transformation ou de décès par rapport au temps du diagnostic fait sur des biopsies. (B) : La probabilité de survie cellulaire sans risque de rechute par rapport au temps du diagnostic fait sur des biopsies. (C) Probabilité de survie par rapport au temps du diagnostic fait sur des biopsies. Le temps ici est représenté en mois. Les patients possédant la mutation au niveau de la voie NOTCH2 sont représentés par les courbes rouges et les patients ne possédant pas de mutation au niveau de la voie NOTCH2 sont représentés par les courbes bleues. Le nombre total de patients de chaque analyse est représenté sur l'axe des abscisses.

### 3. Les traitements disponibles pour traiter les patients SMZL

Il n'existe aucun essai clinique spécifique pour traiter les patients SMZL. Les traitements disponibles pour traiter les patients SMZL consistent dans la plupart du temps à un recours chirurgical (splénectomie), à un traitement par chimiothérapie et un traitement

seul ou combiné avec le rituximab (anticorps bloquant CD20). Des antiviraux sont également utilisés en parallèle de ces traitements pour les patients SMZL, positif pour le VHC (Troussard X et al., 1996, Chacon et al., 2002, Saadoun D et al., 2005, Mulligan SP et al., 1991, Tsimberidou AM et Iannitto E et al., 2015). L'évaluation des différents stades et réponses aux traitements de la maladie doivent répondre à des critères spécifiques, il s'agit de la classification de Lugano (Cheson et al., 2014). L'évaluation des réponses face aux différents moyens de traiter les patients sont évalués par le taux de réponse complète (RC). L'établissement du taux de RC se fait après la splénectomie. Le compte des cellules, l'analyse histologique de la MO ainsi que des analyses en cytométrie de flux sont effectués pour le calcul du taux de RC chez les patients SMZL. Dans ce sous-chapitre, je vais décrire les différents moyens de traitements ainsi que leurs différences en termes d'efficacité.

### 3.1. La splénectomie :

La splénectomie est une ablation chirurgicale de la rate lorsque celle-ci est de taille importante (splénomégalie). L'approche chirurgicale permet d'enlever un nombre significatif de cellules tumorales et améliore le confort au niveau abdominal. Cela a permis de diminuer la cytopénie dû à une séquestration des cellules (Lenglet J et al., 2014). Cependant, les conséquences à court et long-termes entraînent de graves complications, respectivement, des complications péri-opératives et l'immunosuppression. La splénectomie n'est pas recommandée pour les patients SMZL ayant des comorbidités et pour les patients âgés. La splénectomie est contre-indiquée pour les cas ayant une dissémination.

### 3.2 Traitement à base de rituximab :

Il s'agit d'un traitement alternatif de la splénectomie et de la chimiothérapie. Les patients sont traités 1 fois par semaine pendant 6 semaines suivi d'une phase de

maintenance à 1 fois tous les 2 mois pendant 1 à 2 ans. Après la phase d'induction, les chercheurs observent que 2 ans après le traitement à base de rituximab, le RC est à 45% et le PFS est 92% (Kalpadakis C., et al., 2013). Ce traitement est recommandé pour les patients n'ayant pas de dissémination et pour les patients ayant une contre-indications pour le recours chirurgical. Des traitements combinatoires : rituximab et chimiothérapies sont également considérés pour les patients ayant une dissémination et/ou à un stade avancé de la maladie (Dreyling et al., 2013).

Une étude clinique dans laquelle les patients ont été traités par une combinaison : rituximab, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin et prednisone (R-COMP) ont montré qu'à 3 ans après ces traitements, le taux de réponse est 84% et 54% pour le PFS avec un taux de survie à 72% (Iannitto et al., 2015). Cependant, au cours de ces essais cliniques, la toxicité de cette combinaison a été conclue comme non négligeable (Iannitto et al., 2015).

A ce jour, des essais cliniques sont en cours pour traiter les MZL. Ces essais cliniques portent sur une immunothérapie à l'aide nouveau anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine CD20. Cependant, il n'existe aucun essai clinique spécifique pour les patients SMZL (revue : Arcaini et al., 2017).

## **Objectif de la thèse**

Les études mutationnelles faites sur les cohortes de patients SMZL ont donc mis en évidence la mutation spécifique et récurrente au niveau de l'ICN2. Les patients possédant cette mutation somatique de gain-de-fonction ont de très faible taux de survie. Les mécanismes moléculaires induits par NOTCH2 dans la pathogenèse restent obscurs. A ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique pour traiter ces patients. La voie signalisation NOTCH2 étant exprimée de façon ubiquitaire, il est difficile de traiter les patients avec un inhibiteur de l'activité de la voie de signalisation NOTCH2. En effet, des essais cliniques faits sur les patients atteints de LAL-T avec des inhibiteurs de la gamma-sécrétase ont mis en évidence des graves effets secondaires chez ces patients. Il est ainsi peu probable que les patients SMZL soient traités avec des GSI. C'est la raison pour laquelle, identifier les gènes cibles directs de NOTCH2 permettrait une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires d'initiation et de progression de ce lymphome B. Par conséquent, cela permettrait d'identifier les voies de signalisations essentielles qui pourraient être de potentiels cibles thérapeutiques. Ainsi, tout au long de ma thèse, je me suis intéressée à identifier les gènes cibles directs de NOTCH2 induits dans les SMZL. Pour ce faire, j'ai dans un premier temps, caractérisé le modèle cellulaire Ri-1 comme modèle d'étude *in vitro* de la voie de signalisation NOTCH dans un contexte cellulaire et génétique proche des patients atteints de SMZL. Par la suite, j'ai réalisé un séquençage d'ARN afin de permettre l'identification des changements transcriptionnels induits par NOTCH2 dans cette lignée SMZL. De par les données obtenus, j'ai validé les fonctions biologiques de ces gènes cibles potentiellement directs identifiés par des expériences de perte de fonction et par des expériences de complémentation fonctionnelle. Le schéma ci-dessous résume l'objectif de ma thèse (Figure 17).

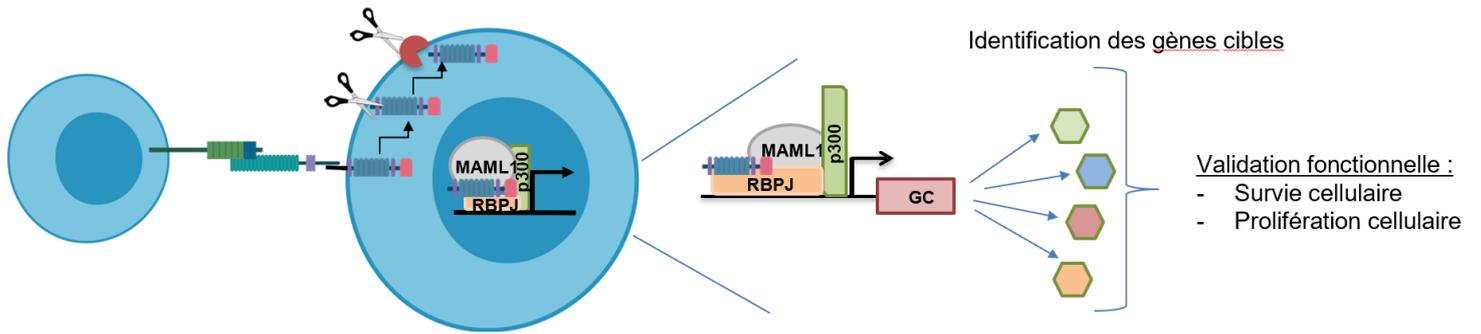


Figure 17 : Schéma explicatif de l'objectif de ma thèse.

## **Résultats**

Les résultats sont présentés sous forme d'article que je vais soumettre d'ici la fin de ma thèse.

Dans cette étude, j'ai caractérisé le modèle cellulaire SMZL : les cellules Ri-1. J'ai montré que ces cellules expriment NOTCH2 et présentent une activité constitutive de la voie de signalisation NOTCH qui est requise pour la survie cellulaire. A partir de ce modèle cellulaire, j'ai réalisé un séquençage d'ARN afin d'identifier le programme transcriptionnel de la voie de signalisation NOTCH induit dans les cellules Ri-1. Le traitement de ces cellules avec du GSI a permis d'identifier un oncogène connu et retrouvé dans de nombreux cancers : *MYC*. J'ai donc caractérisé sa fonction biologique dans les cellules Ri-1 avec des expériences de perte de fonction et de gain de fonction. Les résultats obtenus nous ont permis de suggérer que l'expression de MYC induit par la voie NOTCH est requise pour la survie des cellules SMZL.

# NOTCH-induced MYC expression is required for Marginal Zone Lymphoma cell survival

Bun M<sup>1</sup>, Laiguillon M-C<sup>1</sup>, Benbarche S<sup>1</sup>, and Lobry C.<sup>1</sup>

1. Inserm U1170, Institut Gustave Roussy, Université Paris-Saclay

**Key words:** *B lymphoma, NOTCH2, MYC, Cell survival*

## Abstract

Activating mutations in the gene encoding the cell-cell contact signaling protein NOTCH2 are found in 25% of splenic marginal-zone lymphoma (SMZL) patient. However, NOTCH2 target genes induced during transformation and responsible for SMZL pathogenesis are still unknown. Here, we aim to identify NOTCH2 target genes that could play a role in SMZL pathogenesis. Using RNA sequencing following Notch signaling inhibition by gamma-secretase inhibitors (GSI), we have identified transcriptome wide transcriptional changes induced by Notch signaling in a SMZL cell line (Ri-1). Among genes that are significantly inhibited by GSI and re-expressed after the GSI washout and among top hits in a shRNA drop out screen, we pinpointed c-MYC oncogene. Additionally, using RNA interference experiments and CRISPR activation (CRISPRa), we show that cell survival and proliferation induced by NOTCH activity are mainly mediated by MYC expression suggesting that MYC is one of the main NOTCH2 target gene involved in SMZL.

## Introduction

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a distinct lymphoma entity in the WHO (World Health Organization) classification (Isaacson P.G et al., 1997). SMZL is a rare indolent B-cell neoplasm involving spleen, bone marrow (BM) and frequently the blood. It mainly affects elderly patients without gender predilection. Clinical features are characterized by prominent splenomegaly and bone marrow and peripheral blood infiltration. In 20% of the case, autoimmune manifestations are found in SMZL patients (Thieblemont C. et al., 2002). In contrast to many other B cell malignancies, SMZL is not associated with recurrent balanced translocations. Several studies based on mutational analysis have shown that *NOTCH2* mutations are recurrently found in SMZL patients (Kiel MJ., et al., 2012).

Morgan first described the NOTCH gene in *Drosophila melanogaster* in 1917 (Morgan T, 1917). In human, four Notch receptors (Notch 1 to 4) and five ligands (Jagged 1, 2 or Delta 1, 3, 4) are reported (Ellisen et al., 1991, Weinmaster et al., 1991, 1992, Lardelli et al., 1994, Uyttendaele 1996, Lindsell et al., 1995, Shawber et al., 1996, Bettenhausen et al., 1995 and Dunwoodie et al., 1997). The Notch proteins are single-pass transmembrane receptors composed of an extracellular domain responsible for binding Notch ligands, and an intracellular domain (NICD) carrying transcriptional transactivation activity. Upon ligand binding to Notch extracellular domain, two successive proteolytic cleavages occur. The second cleavage operated by the gamma-secretase complex leads to the release of NICD in the cytoplasm. NICD is then translocated to the nucleus where it binds RBPJ and recruit co-activators leading to the transcription of its target genes (Kopan R. et al., 2009, Oswald F. et al., 2001). This activation is then stopped by phosphorylation, ubiquitination, and degradation by the proteasome thanks to the regulatory PEST domain (proline-glutamate-serine-threonine) on the C-terminal (Gordon WR et al., 2008). The *NOTCH* family of transmembrane receptor proteins is important for mediating cell fate determination and differentiation in a variety of embryonic and adult tissues (Artavanis-Tsakonas et

al., 1999). During the hematopoietic differentiation, NOTCH signaling is known to influence cell fate decision in B and T lymphocyte differentiation (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999). Furthermore, Saito and its collaborators have shown that NOTCH2 has a key role in B cell specification into cells of the marginal zone lineage in spleen (Saito et al., 2003).

NOTCH2 target genes involved in physiological marginal zone B cell differentiation and involved in SMZL pathogenesis are currently unknown. Here, we aim to identify NOTCH2 target genes that could play a role in SMZL pathogenesis. In this study, using RNA-seq following NOTCH signaling inhibition by gamma-secretase inhibitor, we have identified transcriptional changes induced by NOTCH signaling in a SMZL cell line; Ri-1. Among them, we have identified inhibition of a c-MYC activated transcriptional program and direct regulation of MYC oncogene. Using RNA interference and CRISPR activation (CRISPRa), we show that c-MYC is induced by NOTCH2 activity and drives the cell proliferation and survival in Ri-1 cells. Identifying NOTCH2 target genes induced in SMZL could provide a better understanding of the molecular mechanisms and establish specific and targeted therapies.

## **Materials and Methods**

**Cell lines and reagents.** SMZL Ri-1 cell line was obtained from DSMZ German collection of microorganisms and cell cultures. They were grown in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FBS and 1% Penicilin/Streptomycin. 293T cell line was similarly obtained from DSMZ German collection of microorganisms and cell cultures. They were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle) medium (Sigma) supplemented with 10% FBS and 1% Penicilin/Streptomycin. Cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

**Sanger Sequencing.** Ri-1 cell line DNA was extracted using lysis buffer (10mM of Tris-Cl pH 8.5, 5 mM of EDTA, 200mM of NaCl, 0.2% of SDS, 100µg/mL Proteinase K) that have been incubated overnight. Then phenol-isoamyl-chloroform extraction was used

to harvest aqueous phase containing DNA. DNA was then amplified by Phusion PCR. Premixes containing 1ug of DNA, and 10 pmol/uL of primer (Table 1) were sent to Eurofins Genomics. Primers that were used to sequence are: N2IC\_geno-FWD (5'-CCCCATTGTGACTTTCCAGC-3') and N2IC\_geno-REV (5'-TTCTCTCCCGGATGACCTTC-3').

**Gamma-secretase inhibitor (GSI) treatment and washout.** Ri-1 cells were treated with GSI, Compound E (CompE) from Millipore, Calbiochem® (Cat: 565790-1MG). Cells were treated with 10µM of CompE for 6h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. For the washout, Ri-1 cells treated with GSI were all washed out twice at 4°C with PBS and put back in culture at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 2h.

**IC50.** 1 million of Ri-1 cells were treated overnight with these following concentrations: DMSO, 0.1µM, 1µM, 10µM and 50µM. Apoptosis assessment was performed on 0.5 million cells using 7AAD and AnnexinV staining. Survival rate was then calculated. Using GraphPad PRISM program, we normalized all data, transformed x axis values into log base 10. IC50 was calculated by the software (Supplemental 1D).

**RT-qPCR.** RNA was extracted using Omega Bio-Tek E.Z.N.A® Total RNA Kit I following manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from RNA with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher). qPCR was done using SYBR green PCR reagent (Promega, GoTaq® qPCR Master) and was performed with QuantStudio 6 and 7 Flex (Thermofisher). Primers used in qPCR are summarized in the table 1.

**RNA sequencing (RNA-seq) and library preparation.** RNA-seq was performed on poly(A) selected RNA extracted from 5 million cells of RI-1 cell line in the following conditions: treated with DMSO, treated with GSI and treated with GSI followed by a washout. Poly-(A)-selected, first stranded Illumina libraries were prepared with a modified TruSeq protocol using dUTP method (Parkhomchuk et al., 2009). Three biological replicates per conditions were prepared. AMPure XP size selection selected

libraries were amplified by PCR (maximum 16 cycles) and purified with AMPure XP beads and paired-end sequenced (50 bp) on the Illumina HiSeq 4000 sequencer. Sequencing reads were aligned to the hg19 version of the human genome using and abundance quantified using Kallisto (Bray NL., Pimentel H., Melsted P and Pachter L., 2016). Differential expression analysis was done using sleuth R package w0.3 (Pimentel H., Bray NL., Puente S., Melsted P., and Pachter L., 2017). Gene Set Enrichment Analysis (Subramanian A., Tamayo P., et al., 2015) was performed on a pre-ranked list of genes after filtering out non expressed genes (genes with median FPKM expression below 1 in both compared conditions). Genes were ranked using their Log<sub>2</sub> fold change of expression between compared conditions. GSEA was carried out using MSigDB genesets from C2 common pathways, C3 transcription factors, C4 cancer modules, C5 molecular functions, C6 and Hallmark collections.

**shRNA screen.** 9537 shRNAs were designed to target 954 genes using SPLASH tool (Sequencing of psoralen crosslinked, ligated, and selected hybrids) (Pelosof et al., 2017). Non-targeting shRNAs were included in the pool (1 shRNA targeting Renilla, 1 shRNA targeting Luciferase and 2 shRNAs targeting mouse Lin28) as negative controls and 10 shRNAs targeting the actin b gene (*ACTB*) were used as positive controls. Oligos were synthesized and ordered as a pool of 97-mers (TGCTGTTGACAGTGAGCG(Y)<sub>22</sub>TAGTGAAGCCACAGATGTA(X)<sub>22</sub>TGCCTACTGCCTCGGA). where X is the siRNA sequence and Y its reverse complement) from CustomArray Inc. Double stranded shRNA was amplified by PCR using the 97-mer oligo and the following primers: miRE-Xho-fwd (5'-TGA<sub>ACTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG</sub>-3') and miRE-EcoOligo-rev (5'-TCTCGAATTCTAGCCCCTTGAAGTCCGAGGCAGTAGGC-3). Pooled shRNA library was cloned into SGEP vector (Fellmann et al Cell reports 2013, AddGene #111170) using XhoI and EcoRI restriction sites. Ri-1 cells were infected with shRNA library in duplicate. 50 million cells were infected with 15% transduction efficiency to achieve an effective

multiplicity of infection of less than one shRNA per cell and to ensure library coverage of 1000x. Two days after infection cells were treated with 1 µg/ml puromycin. Two days after puromycin selection, dead cells were removed by Ficoll gradient and 8 million GFP<sup>+</sup> cells were sampled (day 0 of the screen). More than 16 million GFP<sup>+</sup> cells were maintained in the presence of 0.5 µg/ml puromycin at each passage to preserve library representation for the next samplings. 8 million GFP<sup>+</sup> cells sampled at day 0, 7, 14 and 21 of the screen were lysed in 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS supplemented with 0.1 mg/mL RNase A (Thermo Scientific) and 0.2 mg/mL Proteinase K (Invitrogen) for 12 hours at 37°C. Genomic DNA was then isolated by phenol-chlorophorm-isoamyl alcohol extraction using PhaseLock tubes (5PRIME) followed by 100% ethanol precipitation in the presence of 0.1 M sodium acetate and 20 µg/mL glycogen. Genomic DNA was then digested with PstI (New England Biolabs) for 12 hours at 37°C, run on 1% agarose gel to isolate 1500 bp to 2500 bp fraction that contain the sgRNA cassettes using E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek). Deep sequencing libraries were generated by PCR amplification of shRNA cassettes using SGEP\_lib\_P5

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGA  
AGTCCGAGGCAGTAGGCA and SGEP\_LIB\_P7\_barcode\_seq:  
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT(X)<sub>6</sub>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT  
AACCCAACAGAAGGCTCGAGAA where X represents six nucleotide TruSeq indexing  
barcode for Illumina sequencing. We obtained at least 4 µg of 1500-2500 bp DNA  
fraction from 8 million GFP<sup>+</sup> cells that were used in total as template in multiple parallel  
100 µL PCR reactions, each containing 1 µg template, 1x HiFi HotStart ReadyMix  
(KAPA), and 0.125 µM of each primer, which were run using the following cycling  
parameters: 98°C for 2 min; 29 cycles of 98°C for 30 s, 58°C for 15 s, 72°C for 15 s; 72°C  
for 10 min. PCR products (253 bp) were combined for each sample, purified on 1%  
agarose gel using E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, further purified using 1.4 volume of  
AMPure XP beads and sequenced on the Illumina HiSeq 4000 Sequencer (50bp single

end) at a coverage of more than 8 million reads per sample. Data were analysed using maximum likelihood of enrichment algorithm from MAGeCK software (Li et al., 2014).

**RNA interference: shRNA.** ShRNA targeting MYC designs was selected were designed using SPLASH tool (Sequencing of psoralen crosslinked, ligated, and selected hybrids) (Pelossof et al., 2017). 10 different MYC ShRNA were picked and cloned in PGK-SGEP-miRE11 plasmid. The 2 shRNAs showing best knockdown efficiency were kept. MYC shRNAs sequences are displayed on table 2.

**Transfection HEBS/CaCl<sub>2</sub> – virus production - Infection.** 293T cells were plated at semi-confluence level in 3mL of DMEM. Transfection was done with 2x HEBS and 5M CaCl<sub>2</sub>. 1.5 µg of DNA were transfected in 293T cells as well as 1.5 µg of gag/pol and env. Virus is then harvested at 48h to infect 1 million Ri-1 cells. 4mg/mL of polybrene was also added.

**CRISPR activation (CRISPRa).** Single guide RNAs targeting a window of -300 to +500 bp around MYC transcription start TSS were designed from E-CRISP (Heigwer et al., 2014). MYC targeting and control Renilla targeting guide RNAs were cloned in the lentiviral vector: pLV-hU6-sgRNA-hUbc-dCAS9-VP64-T2a-GFP. Ri-1 cells were infected with these different sgRNA. Single guide RNAs targeting *MYC* TSS are displayed on table 3.

**Apoptosis assessment.** Ri-1 cells infected with sgRenilla or sgMYC, Ri-1 cells infected with shMYC or shRenilla and Ri-1 cells treated with DMSO or 10µM of CompE were harvested and stained with 7AAD-PerCPCy5.5 and AnnexinV-PE from BD Pharmigen PE Annexin V Apoptosis Detection kit I. Apoptosis assessment was then analyzed by flow cytometry on FACS Canto X (BD Biosciences). FACS plots were analyzed using FlowJo 9.

## SMZL whole transcriptome microarray data analysis

Microarray datasets of SMZL-patients whole transcriptome was accessed on GEO database using accession numbers GSE35348 and GSE146814. RMA normalized data for probesets corresponding to NOTCH2, MYC and HES1 genesets were extracted and the probeset of highest signal was kept for each gene. Expression values were plotted using R package ggplot2.

**Statistical test.** Comparison of continuous and categorical variables between subgroups was performed by Student test (t.test).

## Analysis

All barplots and scatterplots were done using GraphPad PRISM. Heatmap was done using R Studio 1.2.1335 program using heatmaply and volcano plot was done using ggplot2 package.

Table 1. Human qPCR primers.

HES1_FWD	5'- GAAAGATAGCTCGCGGCATTCC
HES1_Rev	5'- CTCGTTTCATGCACTCGCTGAAG
GAPDH_FWD	5'-CTTTTGCGTCGCCAGCCGAG
GAPDH_Rev	5'- CCAGGCGCCCAATACGACCA
MYC_FWD	5'- GCTGCTTAGACGCTGGATTT
MYC_Rev	5'- CGAGGTCATAGTTCCTGTTGG

Table 2. shMYC sequences.

shRenilla	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCGTGCCAATAAGTACATGGTAATAGTGAAGCCACA GATGTATTACCATGTACTIONTATTGGCACATGCCTACTGCCTCGGA -3'
-----------	---

shMYC_1	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCCACCTATGAACTTGTTTCAAATAGTGAAGCCACAG ATGTATTTGAAACAAGTTCATAGGTGATGCCTACTGCCTCGGA -3'
shMYC_3	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGAACCTATGAACTTGTTTCAAATTAGTGAAGCCACAG ATGTAATTTGAAACAAGTTCATAGGTGTGCCTACTGCCTCGGA -3'

Table 3. sgRNA sequences.

sgRenilla_FWD	5'- CACCTAGATAAGCATTATAATTCC
sgRenilla_Rev	5'- AAACGGAATTATAATGCTTATCTA
sgMYC10_FWD	5'- CACCGCTGGGCTAGGGCGAGAGGG
sgMYC10_Rev	5'- AAACCCCTCTCGCCCTAGCCCAGC
sgMYC11_FWD	5'- CACCGCCTGTTCCAGAGCTGGGCT
sgMYC11_Rev	5'- AAACAGCCCAGCTCTGGAACAGGC

## Results

### Ri-1 cells display constitutive NOTCH activity

To study NOTCH2-induced signaling in SMZL we seek a cell line harboring recurrent NOTCH2 mutation found in SMZL patients. Thanks to the Cancer Cell Line Encyclopedia (Barretina et al., 2012), we pinpointed the Ri-1 cell lines as the only cell line harboring NOTCH2R2400\* mutation. To ensure that this cell line exhibit the specific NOTCH2 mutation found in SMZL patient, we first extracted genomic DNA, amplified NOTCH2 exon 34 by PCR and Sanger sequenced the amplified fragment (Supplemental Figure 1A). As reported by the CCLE, we found a C to T nucleotide heterozygous substitution at 7198 position changing arginine at position 2400 into a premature stop codon (R2400\*) corresponding to the PEST domain confirming that Ri-1 cells harbor the

specific NOTCH2 mutation recurrently found in SMZL patients (Supplemental Figure 1A).

To check whether Ri-1 cells express NOTCH2 receptor and/or any other NOTCH receptor on surface, we performed a qPCR for all-4 NOTCH receptors (Figure 1A), and observed that relative quantification shows that NOTCH2 is the main NOTCH receptor expressed in this cell line. This relative quantification was confirmed by absolute quantification using RNA-sequencing that shows that NOTCH2 is the main NOTCH receptor expressed followed by NOTCH1 (Figure 1B). NOTCH2 expression and presentation at the plasma membrane was confirmed by flow cytometry staining with an antibody specific for NOTCH2 extracellular domain (Supplemental Figure 1B). As qPCR and RNA-seq showed some expression of NOTCH1 receptor we thought to investigate if NOTCH1 signaling is activated in Ri-1 cells. To assess NOTCH1 activation we performed a western blot using an antibody specific for the activated cleaved form of NOTCH1 (NICD). CUTTL1 T-ALL cell line was used as a positive control of NOTCH1 activation. As shown by western blot analysis we couldn't detect any cleaved activated form of NOTCH1 in Ri-1 cells whereas CUTTL1 cells presented with a strong band at the expected NICD size, band that was inhibited using Gamma Secretase Inhibitor (GSI) compound-E confirming the staining specificity (Supplemental Figure 1C).

To assess whether NOTCH signaling is constitutively active in this cell line, we performed a qPCR on *HES1*. *HES1* is a well-characterized NOTCH target gene in almost all tissues where NOTCH signaling is active, *HES1* is used as here as a NOTCH activity readout. Ri-1 cells were either treated with DMSO or 10 $\mu$ M of compound-E for 6 hours, harvested and subjected to RNA extraction. Using qPCR to detect *HES1* gene expression we observed that *HES1* was expressed and significantly downregulated upon GSI treatment of Ri-1 cells (Figure 1C) using a non-toxic GSI concentration below IC50 (Supplemental figure 1D). Interestingly, the magnitude of *HES1* expression and inhibition upon GSI treatment in Ri-1 cells was similar Jurkat T-ALL cell line known to present with constitutive NOTCH1 activation (Figure 1C).

Taken together these results show that Ri-1 cells harbor constitutive NOTCH signaling activation and suggest that this activation is mainly due to NOTCH2 receptor as the other expressed NOTCH receptor in this cell line, NOTCH1 doesn't show any detectable constitutive activation.

### **NOTCH signaling activity is required for Ri-1 cell survival.**

To check whether Ri-1 cells are dependent on NOTCH activity, we treated Ri-1 cells with 10  $\mu$ M of CompE for 4 days (Figure 1D). At each day, proportion of apoptotic cell was monitored using Annexin V and 7AAD staining. Continuous GSI treatment induced significant increase of apoptosis rate of Ri-1 cells whereas DMSO treatment didn't induce any overt apoptosis (Figure 1D) at 10 $\mu$ M concentration, a concentration not showing toxicity in short term treatment but sufficient to inhibit constitutive NOTCH activity (Supplemental Figure 1D). These results show that NOTCH activity is required for survival of Ri-1 cells.

### **MYC transcriptional program is regulated by NOTCH signaling in Ri-1 cells**

To identify the transcriptional program regulated by NOTCH signaling in SMZL cells, RNA sequencing (RNA-seq) was performed on Ri-1 cells under the conditions: Ri-1 cells treated with DMSO, Ri-1 cells treated with 10 $\mu$ M compE for 6 hours and Ri-1 cells treated with 10 $\mu$ M CompE for 6 hours and followed by a drug wash-off and a subsequent two hours incubation without CompE. This allows a timed activation of *NOTCH* (Bailis W., Yashiro-Ohtani Y., and Pear WS., 2014). Differential expression analysis revealed that 3375 genes are significantly modulated upon GSI treatment of Ri-1 cells (Supplemental 2A-C). Within those, a majority of 2037 genes are downregulated in accordance with NOTCH signaling being a transcriptional activator. Among those downregulated genes, 728 genes are subsequently re-expressed following GSI "wash-off" (Figure 2A).

To determine biological pathways that involve genes being significantly modulated upon GSI treatment and GSI wash-off, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using Hallmarks genesets (MSigDB) on pairwise comparisons GSI-treatment vs DMSO-treatment and GSI-wash-off vs GSI treatment and focused on gene sets that were significantly depleted in the former and concomitantly significantly enriched in the later. This analysis revealed 14 gene sets following this pattern (Figure 2B) and among them several gene sets associated with *MYC* transcriptional signatures (Figure 2C). To assess whether modulation of these *MYC* transcriptional signatures was due to *MYC* gene expression modulation, we explored our RNA-seq data and performed qPCR on Ri-1 cells treated with GSI and Ri-1 cells treated with GSI followed by GSI wash off. Both analyses revealed that GSI treatment significantly inhibited *MYC* expression and that GSI wash off allowed rapid re-expression of *MYC* to similar extent as *HES1* gene (Figure 2D). These results show that NOTCH signaling regulate *MYC* transcriptional program through direct activation of *MYC* expression.

### **shRNA screening reveals MYC as an essential dependency in Ri-1 cells**

To identify essential genes for Ri-1 cells proliferation and survival, we performed an shRNA drop out screen using a custom-made library of 9542 hairpins targeting 957 genes mainly involved in epigenetic regulation, oncogenic signal transduction and oncogenic transcription factors. Screening was performed in duplicate in Ri-1 cells infected at a MOI of 0.25 with the shRNA library cloned in a lentiviral mir-E expression vector. Infected cells were sampled 2 days after infection to assess original complexity of the library and subsequently sampled at days 7, 14 and 21 post infection. Analysis of biological replicates showed that the representation of 500 shRNAs targeting 50 genes was significantly (FDR < 0.05) decreased over time whereas 110 shRNAs targeting 11 genes were significantly over-represented (data not shown). Among top hits of the screen several genes known to play essential roles in B cell lymphoma and leukemia pathogenesis such as *BCL2*, *ARID1A*, *TCF4* and *MYC* were identified (Figure

3A-B). Interestingly, 14 of these top hits were among genes significantly inhibited upon GSI treatment of Ri-1 cells but only one, *MYC*, was significantly re-expressed after GSI wash off (Figure 3C-E) suggesting that *MYC* is one of the main NOTCH signaling induced dependency in this lymphoma cell line.

We next thought to validate *MYC* as an essential dependency in Ri-1 cells by using independent hairpins for *MYC* knock down. Since previous studies have shown that *MYC* has a critical role in lymphoma cell growth, we decided to assess cancer cell proliferation when *MYC* is depleted. We first infected Ri-1 cells with either non-targeting shRenilla control or shRNAs targeting *MYC*. After controlling for knockdown efficiency of *MYC* mRNA using qPCR (Figure 4A). We then performed a follow-up of proportion of infected cells in a competitive assay with non-infected cells every other day. Competition assay of non-infected Ri-1 cells with Ri-1 cells infected with non-targeting shRenilla was used as a control. Whereas shRenilla expression has no impact on infected Ri-1 cell growth, Ri-1 cells infected with the two different shRNA targeting *MYC* mRNA were out competed in growth by non-infected cells (Figure 4B). These data confirm the shRNA screening results and pinpoint *MYC* expression as an essential dependency for Ri-1 cell growth and/or survival.

### **NOTCH independent *MYC* expression rescues GSI-induced Ri-1 apoptosis**

To validate that *MYC* expression-induced Ri-1 cells survival is the main downstream effect of NOTCH signaling we performed rescue experiments. To achieve NOTCH-independent *MYC* expression, we used a CRISPR activator system (CRISPRa). CRISPRa relies on the use of catalytically inactive Cas9 (dCas9) coupled to a transcriptional transactivator domain such as VP64 (dCas9-VP64) allowing activation of gene expression when properly targeted by a specific single guide RNA (sgRNA) (Figure 5A). Ri-1 cells were infected with a lentiviral expression vector allowing co-expression of the dCas9-VP64 fusion protein together with a single guide RNA which expression is driven

by a PolIII U6 promoter. Two independent sgRNA targeting *MYC* were designed in a window of -300 to +50 bp around its Transcription Start Site (TSS). A non-targeting control sgRNA was designed against the Renilla sequence (sgRenilla). Infected Ri-1 cells were then treated with DMSO or Compound-E. Using qPCR, we assessed *MYC* expression level and observed that Compound-E treatment in Ri-1 cells infected with sgRenilla induced a significant downregulation of *MYC* whereas *MYC* expression levels were maintained in Ri-1 cells expressing *MYC* specific sgRNAs (Figure 5C). Measurement of apoptosis rates using AnnexinV and 7-AAD stainings revealed that Compound-E treatment of Ri-1 cells infected with non-targeting sgRNA significantly induced apoptosis whereas no significant apoptosis induction was observed in Ri-1 cells expressing *MYC*-targeting sgRNAs (Figure 5B). Compound-E induced NOTCH signaling inhibition was efficient in all conditions as shown by significant inhibition of *HES1* expression (Figure 5D).

Taken together, we concluded that forced *MYC* endogenous expression in Ri-1 cells treated with CompE restores cell survival activated by NOTCH oncogenic program. Therefore, *MYC* is critical and sufficient to rescue Ri-1 cells from NOTCH2 inhibition.

### ***MYC* expression is correlated to NOTCH2 expression in SMZL patient whole transcriptome datasets**

To explore whether *MYC* expression is associated to *NOTCH2* expression in SMZL patients, we interrogated a previously published microarray dataset of 27 SMZL-patients whole transcriptome (Watkins AJ et al., 2012). Re-analysis of this dataset showed a strong and statistically significant correlation between *MYC* and *NOTCH2* expression levels (Figure 6A) to a similar extent as the correlation between *NOTCH2* and *HES1* expressions, a well-characterized NOTCH signaling target (Figure 6B), whereas no correlation of expression was found against other housekeeping genes such as the alpha subunit of polymerase II (*POLR2A*) an ubiquitously expressed gene

(Figure 6D). We also performed the correlation analysis between *NOTCH1* and *MYC* expression. Remarkably, we observed that there is no correlation between *NOTCH1* and *MYC* expressions. These data suggest that *MYC* is not induced by *NOTCH1* expression in SMZL patients (Figure 6C). These data show that *MYC* expression level in SMZL patients is specifically correlated with *NOTCH2* expression and suggest that *MYC* expression could be directly regulated by *NOTCH2* signaling activity.

## Discussion

NOTCH signaling pathway is critical for several biological processes such as apoptosis, cell survival, stem cell maintenance and cell differentiation (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Therefore, deregulations in NOTCH signaling pathway lead to activation of oncogenic programs depending on cell-context such as in T-cell acute leukemia (Ferrando AA., Neuberg DS., et al., 2002) and in breast cancer (Zardawi SJ., Zardawi I., McNeil CM., et al., 2010, Mikaelian I., Blades N., Churchill GA., et al., 2004).

Previous reports have demonstrated that NOTCH2 signaling is required for marginal zone B cell maturation in the spleen (Saito et al., 2003). Some studies on marginal zone lymphoma have shown that NOTCH signaling is mutated in a large portion of primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma. (Bray et al., 2016). NOTCH2 gene is recurrently mutated in 25% of SMZL patients (Rossi et al., 2012, Kiel MJ et al., 2012). So far, there is no specific treatment to treat SMZL patients. Therefore, in this study, we aimed to understand the molecular mechanisms induced by NOTCH2 signaling activation in SMZL pathogenesis.

To address this biological question, we have exploited and characterized a SMZL cell line: Ri-1 cells (Figure 1, Supplemental figures 1). We have demonstrated that Ri-1 cell line harbors NOTCH2R2400\* mutation found in SMZL patients, mainly expresses NOTCH2 receptor, present a constitutive NOTCH activity essential for its growth and that can be readily inhibited using gamma secretase inhibitors and therefore is a relevant model to study NOTCH2 activation in SMZL pathogenesis.

In this study, we have identified transcriptome wide transcriptional changes induced by NOTCH signaling and have pinpointed *MYC* as an important downstream target of NOTCH activity (Figure 2, Supplemental figure 2). We found that several gene sets associated with *MYC* transcriptional signatures are significantly inhibited upon GSI-induced NOTCH inhibition (Figures 2, Supplemental figure 2). c-MYC is a master transcription factor that regulates the expression of numerous genes in context-specific manners via transcriptional amplification and cofactor-dependent regulation (Hann SR, 2014, Sabo A and Amati B, 2014). c-MYC is fundamental for biological pathways such as biogenesis, metabolism, proliferation, cell cycle, apoptosis, and pluripotency (Conacci-Sorrell M et al., 2014). Consequently, c-MYC is a potent oncogene that is frequently overexpressed in human cancers leading to hallmarks associated with tumorigenesis. For instance, studies on T-ALL have highlighted that NOTCH1 directly controls *MYC* expression (Sato Y., Matsumura I., et al., 2004, Palomero T et al., 2006, Herranz D et al., 2014 and Yashiro-Ohtani Y et al., 2014). NOTCH1 signaling drives a c-MYC mediated transcriptional feed-forward loop promoting cell growth and metabolism. Similarly, in breast cancer, *MYC* has also been identified as Notch1 transcriptional target in transgenic mice (Klinakis A., Szabolcs M., Politi K., et al., 2006). Notch1 promotes tumorigenesis through *Myc* overexpression leading to aberrant hyperproliferation of mouse mammary epithelial cells.

In our studies, we have shown that knocking down *MYC* leads to a significant impairment of Ri-1 lymphoma cell growth and survival (Figure 3 and Figure 4). Furthermore, we also demonstrated that NOTCH independent *MYC* expression rescues GSI-induced Ri-1 apoptosis (Figure 5). These data suggest that NOTCH induces *MYC* expression that then promotes the increase of cancer cell growth and survival in SMZL. These findings are consistent with previous reports done on T-ALL and on breast cancer.

The identification of NOTCH2 as a direct regulator of cell growth genes highlights the role of this transcription factor in B cell transformation and provides a mechanism that

couples B cell growth and survival with developmental decisions in lymphocyte development. Overall, our identification of *MYC* as a potent direct target gene regulated by NOTCH2 in SMZL highlights the importance of this regulation in the pathogenesis of human cancer. This circuitry may tune the cancer cell growth and survival in response to NOTCH2 activation and may potentially enhance the tumoral effect and/or attenuate the antitumor effect of drugs targeting NOTCH signaling similarly to what was demonstrated in T-cell acute leukemia (O'Neil J., Grim J., Strack P., et al., 2007). Further studies based on identifying NOTCH2 binding sites would confirm that NOTCH2 directly bind regulatory elements on promoter or distal enhancers regulating *MYC* expression and it would confirm its involvement in B cell development and transformation.

Identifying NOTCH2 direct target genes could provide a better understanding of molecular mechanisms induced by NOTCH2 leading to the B cell development and transformation into SMZL. Identifying downstream NOTCH signaling targets could open avenues in the design of novel targeted and specific therapies to treat SMZL patients. Hence, identifying *MYC* as a potent NOTCH2 direct target gene provides clues on lymphoma cell growth and survival regulation in SMZL and may be a relevant therapeutic target to treat SMZL patients.

## References

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284: 770–6.

Bailis W., Yashiro-Ohtani Y., and Pear WS., 2014. Identifying direct Notch transcriptional targets using the GSI-washout assay. *Methods Mol. Biol.* 1187: 247-54.

Barretina J., Caponigro G., et al., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 483, 603-607.

Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis M., Simon JL., Guenet A., Gossier A., 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development*. 121: 2407-2418.

Bray NL., Pimentel H., Melsted P and Pachter L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34(5): 525-7.

Bray SJ. 2016. Notch signaling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 17, pp. 722-735.

Conacci-Sorrell M., McFerrin L., and Eisenman RN., 2014. An Overview of Myc and its interactome. *CSH Perspect. Med.* (1): a014357.

Dunwoodie SL., Henrique D., Harrison SM., and Beddington RS., 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development*. 124(16): 3065-76.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 66(4):649-61.

Ferrando AA., Neuberg DS., et al., 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. (1): 75-87.

Gordon WR., Arnett KL., and Blacklow SC., 2008. The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* 121(Pt 19): 3109-19.

Herranz D., Ambesi-Impiombato A., Palomero T., Schnell SA., Belver L., et al., 2014. A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 20(10): 1130-7.

Isaacson P., 1997. Splenic marginal zone lymphoma. *Adv An Path.* 4: 191–201

Kiel MJ., Yilmaz OH., Iwashita T., Yilmaz OH., Terhorst C., and Morrison SJ., 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 121(7): 1109-21.

Klinakis A., Szabolcs M., Politi K., et al., 2006. *Myc* is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. *PNAS.* 103(24): 926269267.

Kopan R., Ilagan MX., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137, pp. 216-233.

Lardelli M., Dahlstrand J., Lendahl U., 1994. The novel *Notch* homologue mouse *Notch 3* lacks specific EGF-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech. Dev.* 46, pp. 123-136.

Li W., Xu H., Xiao T., et al., 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *BMC Method.*

Lindsell CE., Shawber CJ., Boulter J., Weinmaster G., 1995. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell.* 80(6): 909-17.

Mikaelian I., Blades N., Churchill GA., et al., 2004. Proteotypic classification of spontaneous and transgenic mammary neoplasms. *Springer Link.* 6, R668.

O'Neil J., Grim J., Strack P., et al., 2007. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathways activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* 204(8): 1813-1824.

Oswald F., Tauber B., Dobner T., Bourteele S., Kostezka U., Adler G., et al., 2001. p300 acts a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol.* 21(22): 7761-74.

Palomero T., Lim WK., Odom DT., Sulis ML., Real PJ., Margolin A., Barnes KC., et al., 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(48): 18261-6.

Parkhomchuk D., Borodina T., Amstislavskiy V., et al., 2009. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* (18):e123.

Pelossof R., Fairchild L., Huang C-H., et al., 2017. Prediction of potent shRNAs with a sequential classification algorithm. *Nature Biotechnology.* 35, 350-353.

Pimentel H., Bray NL., Puente S., Melsted P., and Pachter L., 2017. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat. Methods.* (7): 687-690.

Pui JC., Allman D., Xu L., DeRocco S., Karnell FG., Bakkour S., et al., 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity.* 11(3): 299-308.

Radtke F., Wilson A., Stark G., Bauer M., van Meerwijk J., McDonald HR., and Aguet M., 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity.* 10, 547-558.

Rossi D., Vladimir T., Fangazio M., Brusca A., Silva R., Spina V., et al., 2012. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of *NOTCH2* and other pathways regulating marginal zone development.

Saito T., Chiba S., Ichikawa M., Kunisato A., Asai T., Shimizu K., et al., 2007. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development.

Satoh Y., Matsumura I., Tanaka H., Ezoe S., et al., 2004. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J. Biol. Chem.* 279(24) : 24986-93.

Shawber C., Nofziger D., Hsieh JJ., Lindsell C., Bogler O., Hayward D., and Weinmaster G., 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development.* 122(12): 3765-73.

Subramanian A., Tamayo P., Mootha VK., et al., 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. USA.* 102(43):15545-50.

Thieblemont C, Felman P, Berger F, et al., 2002. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin. Lymphoma.* 3(1):41-47.

Uyttendaele H., Marazzi G., Wu G., Yan Q., Sassoon D., and Kitajewski J., 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene; is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development.* 122(7): 2251-9.

Weinmaster G., Roberts VJ., Lemke G., 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development.* 113: 199–205.

Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G 1992. Notch2: A second mammalian Notch gene. *Development.* 116: 931–941.

Watkins AJ., Hamoudi RA., Zeng N., et al., 2012. An integrated genomic and expression analysis of 7q deletion in splenic marginal zone lymphoma. *PLOS ONE.* 7(9): e44997.

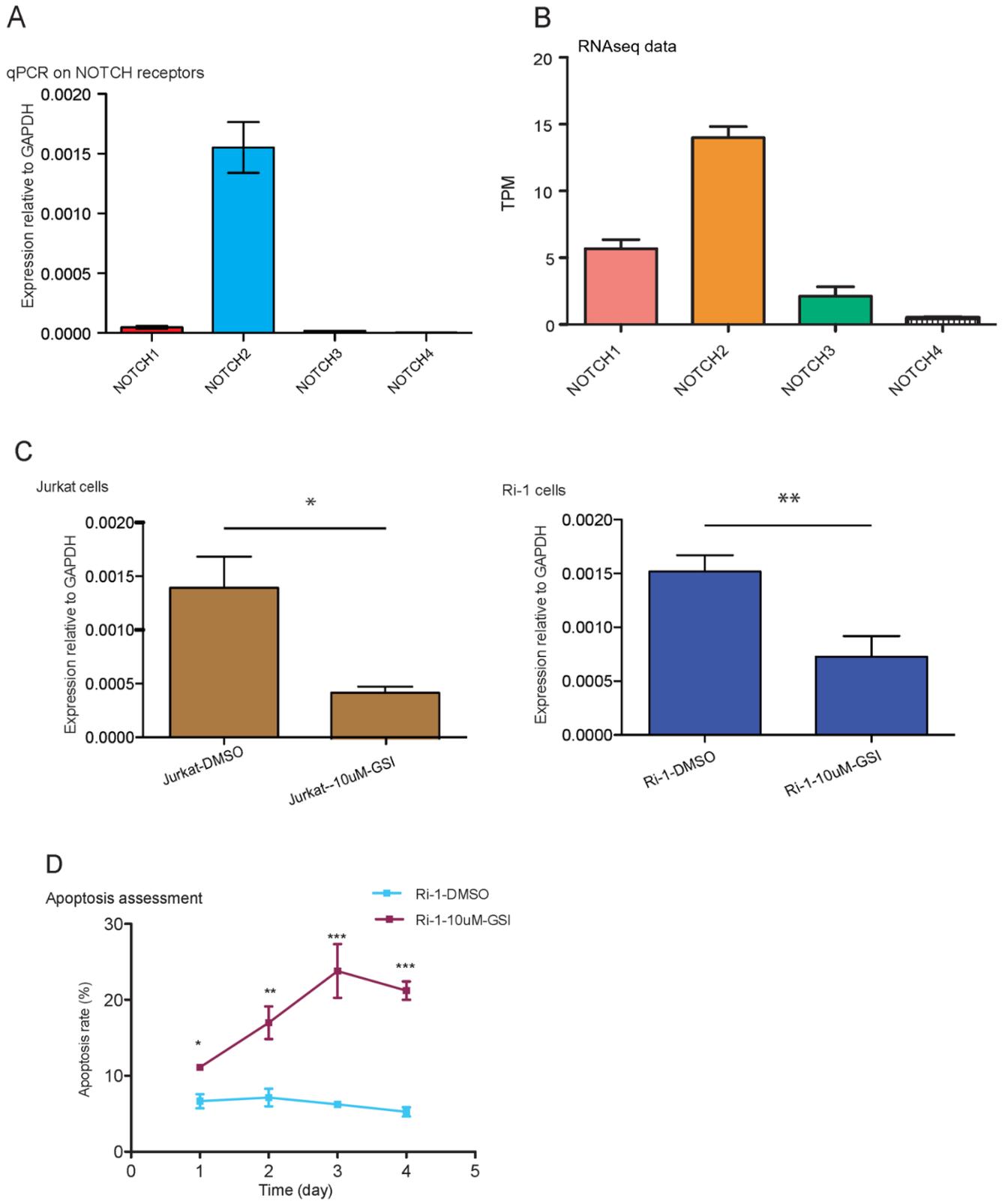
Yashiro-Ohtani Y., Wang H., Zang C., Arnett KL., Bailis W., et al., 2014. Long-range activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(46): E4946-53.

Zardawi SJ, Zardawi I, McNeil CM., et al., 2010. High Notch1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype. *Histopathology*. Vol. 56, Issue 3, pp. 286-296.

**Figure 1: Ri-1 cells display constitutive NOTCH activity that is required for its survival**

(A) Quantitative PCR analysis of Ri-of all-4 NOTCH receptors in Ri-1 cells. Expression are relative to the housekeeping gene expression *GAPDH*. Data are means  $\pm$  SD from triplicate data. (B) Absolute quantification all-4 receptors by RNA-sequencing on Ri-1 cells is represented as mean TPM (=Transcript per million reads mapped) values  $\pm$  SD from triplicate experiments. (C) Quantitative analysis for *HES1* gene expression in Jurkat cells treated with DMSO or 10 $\mu$ M of GSI (left) and Ri-1 cells treated with DMSO or 10 $\mu$ M of GSI mRNAs (right). *HES1* expression is relative to the housekeeping gene expression *GAPDH*. Data are means  $\pm$  SD from triplicate data. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*  $p \leq 0.05$  \*\*  $p \leq 0.005$ . (D) Apoptosis assessment using AnnexinV/7AAD staining at each day for 4 days of Ri-1 cells treated with DMSO (blue) or 10 $\mu$ M of GSI (red). Data are means  $\pm$  SD from triplicate experiments. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ , \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

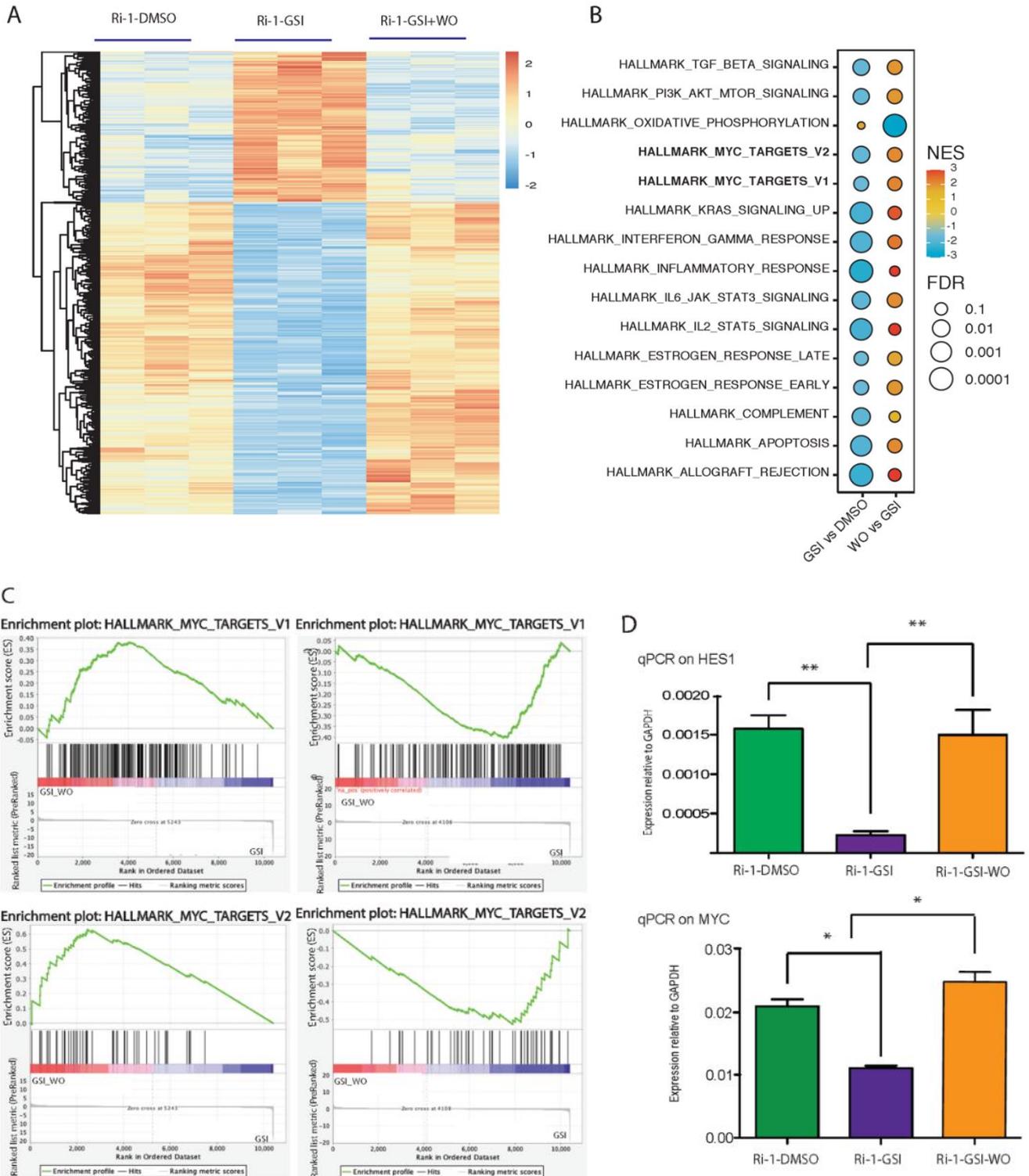
**Figure 1: Ri-1 cells display constitutive NOTCH activity that is required for its survival**



**Figure 2: MYC transcriptional program is regulated by NOTCH signaling in Ri-1 cells.**

(A) Heatmap representing 3375 genes significantly differentially expressed from RNA-seq experiments performed on Ri-1 cells treated with DMSO, or with 10 $\mu$ M of CompE or with 10 $\mu$ M of CompE + wash-off. Values are plotted as row z-score of absolute values. (B) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) on pairwise comparisons GSI-treatment vs DMSO-treatment and GSI-wash-off vs GSI treatment was conducted on MSigDB Hallmarks collection. 14 gene sets that are significantly modulated in the GSI treatment condition and concomitantly significantly modulated in the wash-off condition are displayed. Size of circle represents FDR values and color-coded circle represents normalized enrichment score (NES). (C) GSEA enrichment plots of GSI-wash-off vs GSI treatment (left) and GSI-treatment vs DMSO-treatment (right) from MYC targets V1 and MYC targets V2 Hallmark gene sets (FDR < 0.25). (D) Quantitative PCR for *HES1*(top) and *MYC*(bottom) genes on Ri-1 cells treated with DMSO or treated with 10 $\mu$ M CompE or treated with 10 $\mu$ M of CompE + wash-off. Gene expressions are relative to *GAPDH*. Data are represented as means  $\pm$  SD from triplicate data. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ .

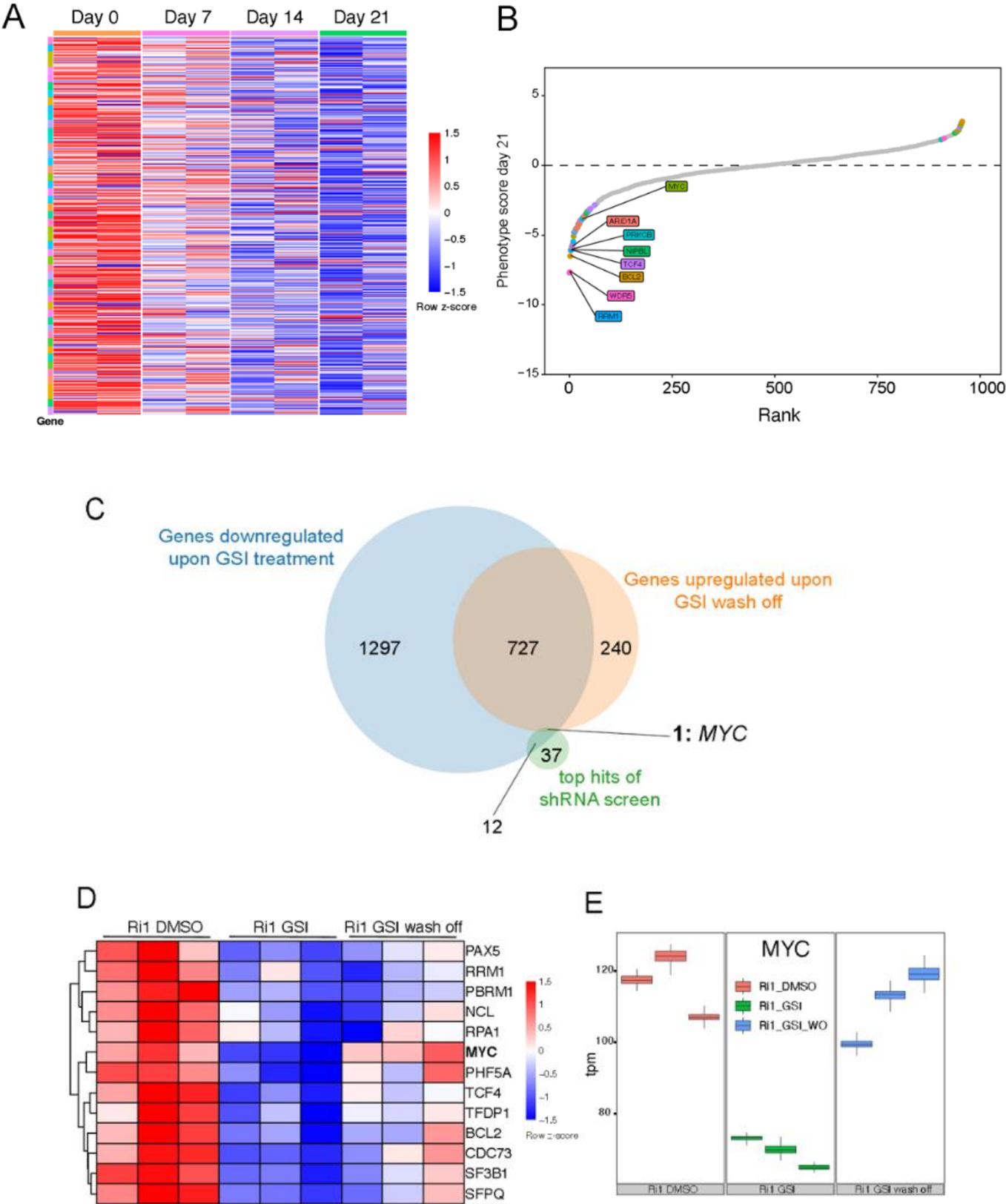
**Figure 2: MYC transcriptional program is regulated by NOTCH signaling in Ri-1 cells**



**Figure 3: shRNA screening reveals MYC as an essential dependency in Ri-1 cells.**

(A) Heatmap showing the variation of normalized counts of the 10 shRNAs that covers each 50 genes that are significantly depleted over time. Values are plotted as row z-score of normalized count values. (B) Dot plot representing of the 954 genes screened ranked by their phenotype score (negative score represents depletion, positive score enrichment). Colored dots represent genes with FDR below 0.05. 7 top hits and MYC are highlighted. (C) Venn diagram showing genes that are significantly downregulated by GSI treatment, upregulated by the GSI-wash-off and the 50 hits from the screen. Their overlap shows that MYC is the only significant screen hit, downregulated by GSI and upregulated by GSI-wash-off. (D) Heatmap depicts RNA-seq expression from 13 hit genes of the screen that overlaps with downregulated genes by GSI. (E) Plot representing bootstrap of MYC expression evaluated by Kallisto in tpm (=transcript per million) from each RNA-seq condition.

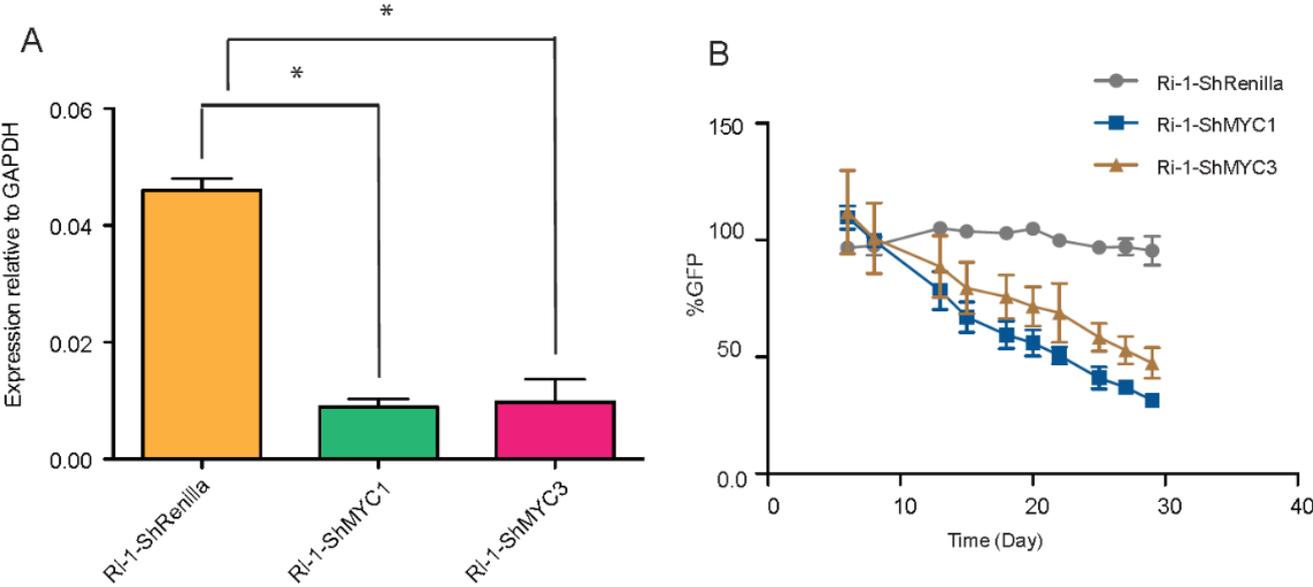
**Figure 3: shRNA screening reveals MYC as an essential dependency in Ri-1 cells.**



**Figure 4: MYC expression as an essential dependency for Ri-1 cell growth and/or survival**

(A) Quantitative PCR of MYC expression in Ri-1 cells infected with shRNAs targeting *MYC* or non-targeting controls (*Renilla*). Data are means  $\pm$  SD from triplicate data. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*  $p \leq 0.05$ . (B) Plot representing the variation cells infected with shRNA targeting MYC (orange and blue) or *Renilla* (gray) (%GFP) over time in a competition assay with non-infected Ri-1 cells.

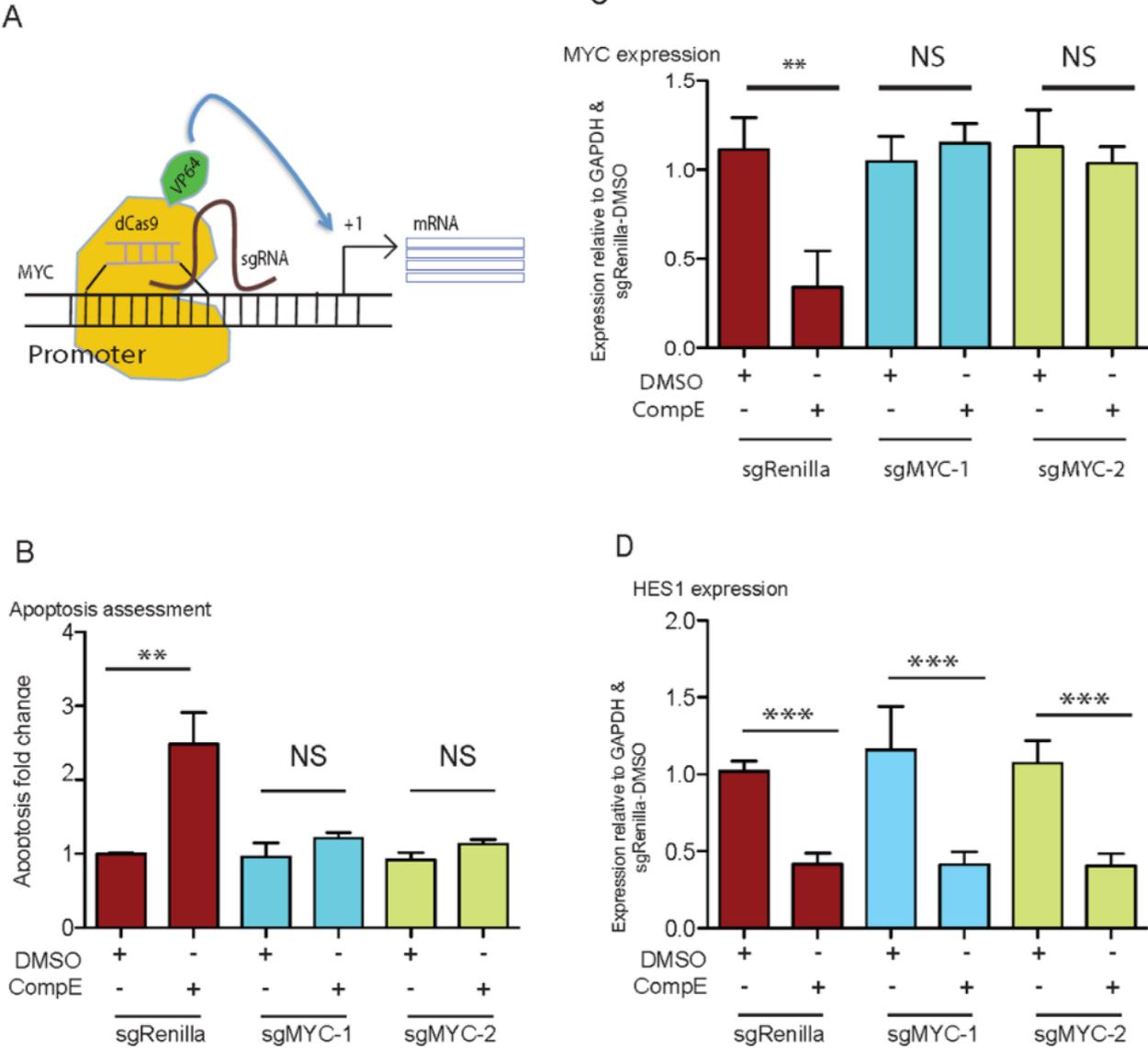
**Figure 4: MYC expression as an essential dependency for Ri-1 cell growth and/or survival**



**Figure 5: NOTCH independent MYC expression rescues GSI-induced Ri-1 apoptosis.**

(A) Scheme that explains the endogenous MYC induction in Ri-1 cells using CRISPRa method. (B) Quantitative PCR of MYC expression in Ri-1 cells infected with sgRNAs targeting *MYC* promoter or non-targeting control (*sgRenilla*) and treated with DMSO or with CompE (10 $\mu$ M). Expression values are relative to *GADPH* and normalized to the negative control condition: *sgRenilla*-DMSO. Data are means  $\pm$  SD from triplicate experiments. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*\*  $p \leq 0.005$ , NS: non-significant. (C) Bar plot representing apoptosis induction assessed using AnnexinV/7AAD staining on Ri-1 cells infected with *sgRenilla* or *sgMYC*. Apoptosis fold change was normalized to the negative control: *sgRenilla*-DMSO. Data are means  $\pm$  SD from triplicate experiments. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*\*  $p \leq 0.005$ , NS: non-significant. (D) Quantitative PCR of *HES1* expression in Ri-1 cells infected with sgRNA targeting *MYC* promoter or non-targeting control *sgRenilla* and treated with DMSO or with CompE. Expression values are relative to *GAPDH* and normalized to negative control: *sgRenilla*-DMSO. Data are means  $\pm$  SD from triplicate data. P-values were calculated using two-tailed Student's t-test: \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

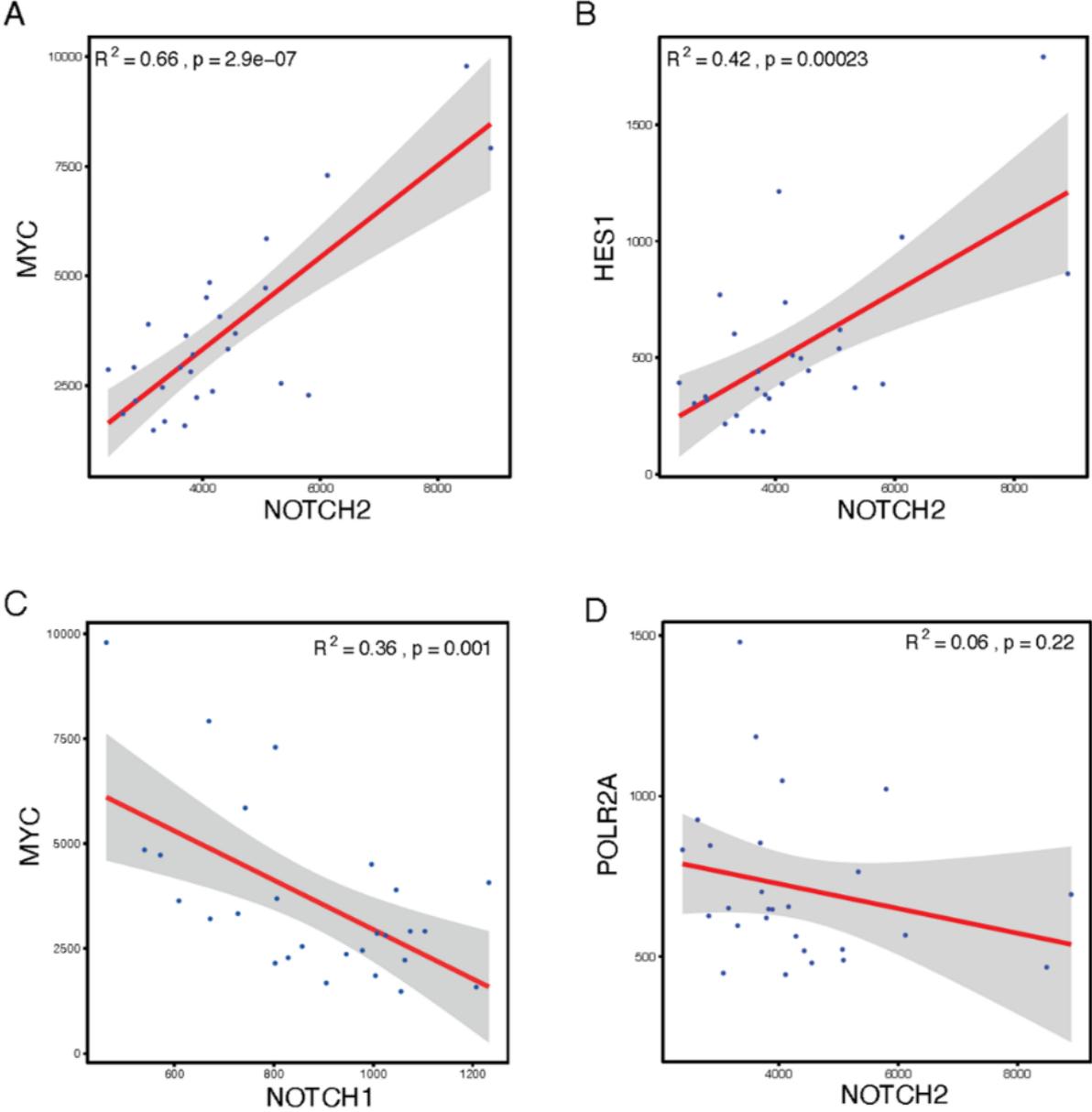
**Figure 5: NOTCH independent MYC expression rescues GSI-induced Ri-1 apoptosis.**



**Figure 6: MYC expression is correlated to NOTCH2 expression in SMZL patient whole transcriptome datasets.**

Scatterplot of gene expressions from microarray datasets of 27 SMZL-patients whole transcriptome (Watkins AJ et al., 2012) showing (A) a positive correlation between *MYC* and *NOTCH2* expressions (B) a positive correlation between *HES1* and *NOTCH2* expressions (C) a negative correlation between *NOTCH1* and *MYC* (D) and *POLR2A*. Blue dots represent plotted values obtained for each of the individuals. The red line corresponds to the best fit for the correlation between them. Spearman coefficient:  $R^2$  and  $p = p\text{-value}$ .

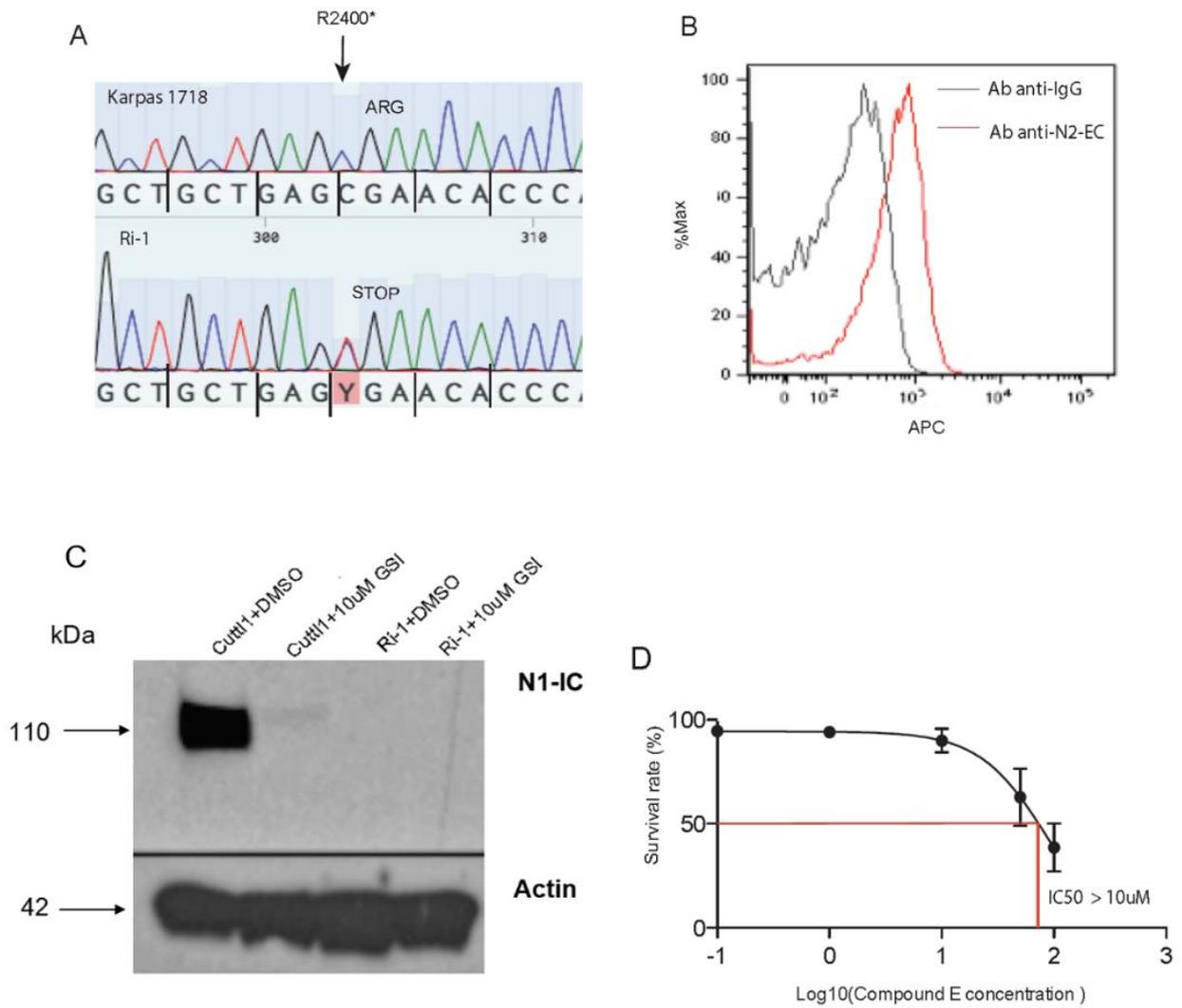
**Figure 6: MYC expression is correlated to NOTCH2 expression in SMZL patient whole transcriptome datasets.**



## Supplemental figure 1

(A) Chromatogram representing Sanger sequencing data of Karpas 1718 (top) and Ri-1 (bottom) cell lines. The black arrow points mutated base (T>C) at position T303C. (B) FACS analysis of Ri-1 cells with either IgG (black) or NOTCH2 receptor (red) antibodies. (C) Western blot analysis of ICN1 and Actin proteins in CUTTL1 and Ri-1 cell lines treated with DMSO or 10 $\mu$ M of compound E. Actin is used as a loading control. (D) Inhibitory dose-response curve to determine IC<sub>50</sub> for CompE in Ri-1 cells. Y axis represents survival rate and x axis represents concentration values transformed into log base 10. Data are means from triplicates  $\pm$  SD. IC<sub>50</sub> is calculated with GraphPad PRISM.

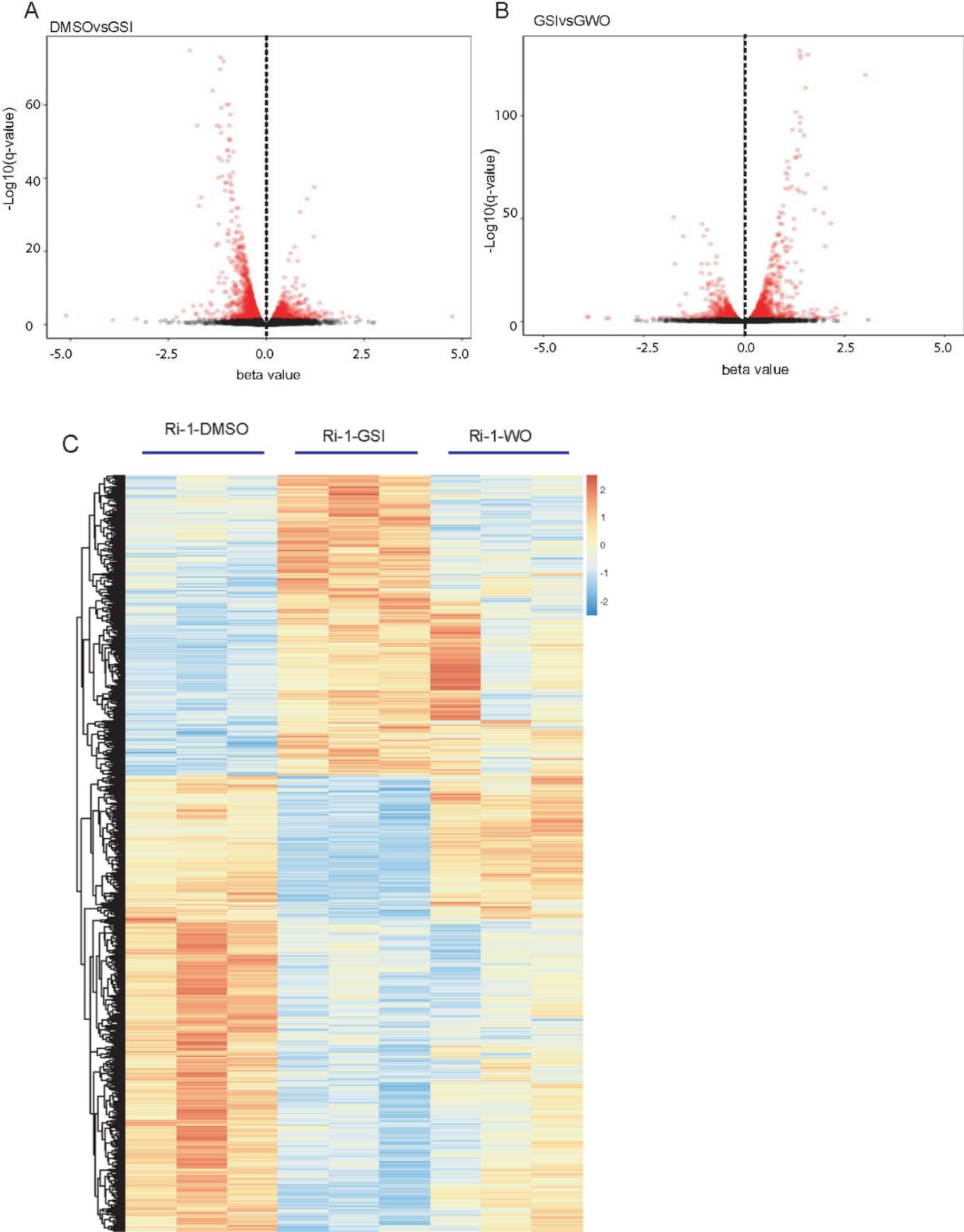
## Supplemental Figures 1



## Supplemental figure 2

Volcano plot displaying differential expression analysis of RNA-seq data from (A) GSI vs DMSO comparison and (B) GSI vs GWO (=GSI Wash Off) comparison. The left panel represents downregulated genes upon, and right panel represents upregulated genes. Y axis shows  $-\log_{10}(\text{q-value})$  and X axis shows beta value (Log<sub>2</sub> Fold Change). (C) Heatmap showing significantly modulated genes between Ri-1 cells treated with GSI compared to Ri-1 cells treated with DMSO and their subsequent modulation upon GSI wash-off. Values are plotted as row z-score of TPM expression values.

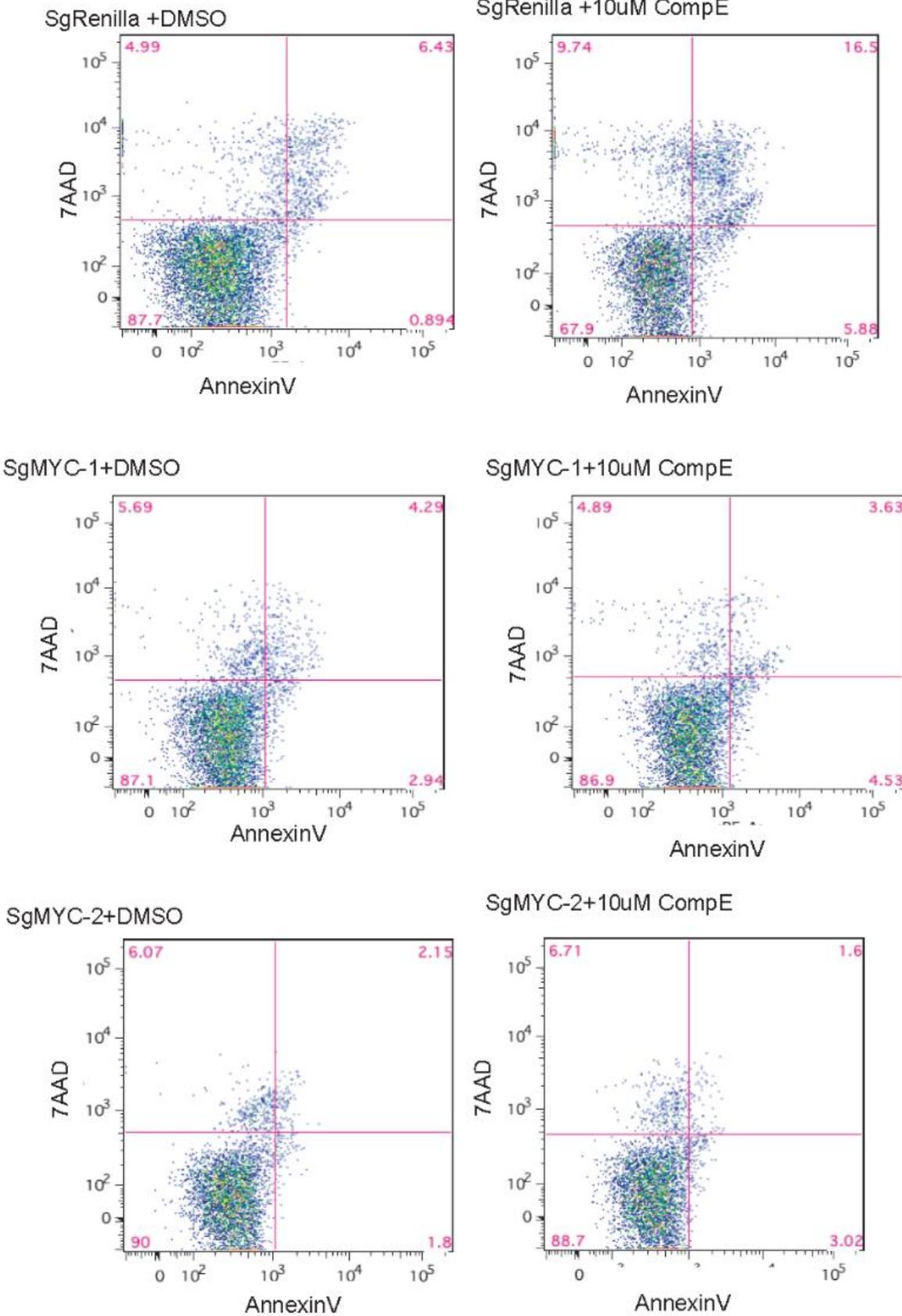
### Supplemental Figures 2



### **Supplemental figure 3**

Representative FACS plots showing AnnexinV/7AAD staining of Ri-1 cells infected with sgRNA targeting MYC promoter or non-targeting control (sgRenilla) and treated with DMSO or 10uM Compound-E (CompE).

**Supplemental figure 3**



## **Conclusions de l'article**

Les mutations activatrices au niveau de la voie NOTCH2 sont retrouvées dans 25% des patients SMZL. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'initiation et de la progression de la maladie induits par la voie NOTCH2 restent encore obscurs. Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogenèse et permettre l'établissement de thérapies ciblées, j'ai cherché à identifier les gènes cibles directs de NOTCH2 qui pourraient jouer un rôle dans l'initiation et la progression des SMZL. Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence l'expression de NOTCH et l'activité constitutive de la voie de signalisation NOTCH dans le modèle cellulaire SMZL : Ri-1. J'ai également réalisé un séquençage d'ARN sur ces cellules selon trois conditions ; traitées avec du DMSO, traitées avec un inhibiteur de la gamma-sécrétase (GSI) et traitées avec du GSI puis lavé de l'inhibiteur (Wash-off, WO). Ces résultats nous ont permis d'identifier un oncogène connu : *MYC*. En parallèle, nous avons réalisé un crible par shRNA. Ce crible suivi d'une validation par déplétion de l'expression de *MYC* par des shRNAs ciblant *MYC* ont démontré que l'expression de *MYC* était essentielle à la survie cellulaire. Nous avons confirmé ces résultats en réalisant un CRISPR activation. Cette expérience permettant l'induction endogène de *MYC* indépendante de la voie de signalisation NOTCH, a permis de montrer que l'expression de *MYC* permet de restaurer la survie des cellules SMZL dans la condition où la voie de signalisation NOTCH est inhibée avec du GSI. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'oncogène *MYC* est indispensable à la survie des cellules tumorales SMZL et pourrait être un gène cible direct de la voie de signalisation NOTCH dans les SMZL.

## **Résultats supplémentaires**

Ce chapitre permet de présenter des résultats d'expériences qui complètent les résultats présentés qui seront soumis dans mon article. Ces expériences sont soit en cours ou soit donnent des résultats négatifs.

### **I. L'identification des sites de fixation de ICN-2 dans les cellules Ri-1**

Dans un premier temps, pour compléter les résultats obtenus par RNA-seq ainsi que la validation biologique de *MYC* dans les cellules Ri-1, j'ai voulu identifier les sites de fixation de NOTCH2 dans les cellules. Pour cela, j'ai voulu réaliser une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) de la partie intracellulaire de NOTCH2 (ICN-2). Cependant, il n'existe aucun anticorps dirigé contre ICN-2 utilisable pour la ChIP.

Le laboratoire de Spyros Artavanis-Tsakonas a développé un hybridome produisant un anticorps monoclonal dirigé contre ICN-2. Nous avons testé l'efficacité de cet anticorps en réalisant un western blot (WB) avec l'anticorps monoclonal de l'ICN-2 et un anticorps anti-HA et une IP avec un anticorps monoclonal ICN-2 (Résultats supplémentaires 1A-B) sur des cellules 293T où nous avons intégré un tag-HA dans l'allèle endogène de ICN-2 avec la technique du CRISPR/Cas9. Nous utilisons ce modèle car nous voulons détecter l'ICN-2 au cas où si l'anticorps monoclonal de l'ICN-2 ne parvient pas à détecter l'ICN-2 en WB. De plus, les IP et les WB faits avec des anticorps anti-HA sont généralement efficace et spécifique. Nous avons constaté que lorsque nous avons fait le WB avec l'anticorps anti-ICN-2 produit par l'hybridome, il n'y a aucune bande correspondante à la taille de l'ICN-2 (110 kDa). Cependant, lorsque nous utilisons cet anticorps anti-ICN-2 en IP, nous observons sur le WB réalisé avec un anticorps anti-HA, une bande correspondant à 110 kDa (Résultat supplémentaire 1A). Ainsi, nous supposons que cet anticorps anti-ICN-2 semble se lier de manière spécifique à l'ICN-2 seulement lorsque la protéine est sous forme native. Afin de vérifier si cet anticorps pouvait être utilisé pour faire une ChIP, nous avons réalisé une IP dans

les mêmes conditions que pour une ChIP (Résultat supplémentaire 1B). Nous avons donc fixé les cellules 293T-HA avant de faire l'IP et le WB. Nous observons qu'il y a une bande à 110 kDa, correspondant à la taille de l'ICN-2. Ainsi, ce résultat suggère que cet anticorps peut être utilisé pour faire une ChIP sur l'ICN-2. Ainsi, nous avons décidé de faire une ChIP avec cet anticorps et en parallèle une expérience de CUT&RUN (= Cleavage Under Target & Release Using Nuclease) (Skene PJ and Henikoff S., 2017) qui est une expérience alternative de la ChIP. Le principe de cette expérience se base sur la digestion par des Nucléases Micrococcaux (pA/MNase) qui sont couplées à des protéines A qui vont se fixer sur l'immunoglobuline de l'anticorps d'intérêt. Cela va permettre le relargage de ces régions où l'anticorps anti-ICN-2 s'est spécifiquement fixé. Les cellules Ri-1 ont été stimulées avec les ligands DLL4 produits par les cellules OP9 qui possède une cassette d'expression du ligand DLL4. Cette stimulation va permettre d'augmenter la disponibilité de la partie intracellulaire de NOTCH2 afin que l'anticorps anti-ICN-2 puissent se fixer sur un maximum de protéines. J'ai également fait une condition contrôle avec un anticorps anti-IgG de souris. Avant de séquencer, j'ai effectué une qPCR avec des primers correspondant soit aux sites de fixation de *HES1* soit aux sites de fixation du gène *NANOG* (contrôle négatif). Les résultats de qPCR de la ChIP (Résultats supplémentaires 1 C-D), montrent qu'il y avait aussi bien un enrichissement sur le site *HES1* que sur le site de *NANOG*. Les résultats de qPCR réalisés sur les ADN obtenues de l'expérience de CUT&RUN présentent également les mêmes résultats que la qPCR sur la ChIP (résultats non montrés). Ainsi, ces données nous suggèrent donc que cet anticorps se fixe de manière aspécifique et donc compromet les expériences de ChIP et de CUT&RUN.

Par la suite, du fait du manque de spécificité de cet anticorps, j'ai donc voulu insérer un tag HA dans l'allèle endogène de ICN-2 à l'aide de la recombinaison homologue par la technique du CRISPR/cas9. J'ai transfecté les cellules Ri-1 par nucléofection. Nous avons constaté que seulement 1% de cellules étaient transfectées avec un taux de survie assez faible. J'ai donc réalisé une autre technique d'électroporation en utilisant

la machine NepaGene. En faisant cela, nous avons obtenu 3% de cellules transfectées avec un taux de survie à 40%. Cependant, après tri, les cellules uniques dans le but de faire des populations monoclonales ayant recombinaison des allèles de *NOTCH2* ne survivent pas. Cela pouvant être dû au fait que ces cellules sont dépendantes de signaux données par les cellules voisines ou que la délétion de *NOTCH2* soit létale.

Plusieurs études ont permis de montrer que les ChIP utilisant des anticorps anti-GFP étaient efficaces. J'ai donc réalisé une fusion protéique entre le ICN-2 possédant la mutation spécifique : R2400\* et un tag GFP. Dans un premier temps, j'ai voulu m'assurer que le tag GFP n'interfère pas avec l'activité de *NOTCH2* dans les cellules (Résultats supplémentaires 1E). J'ai donc transfecté cette construction dans des cellules 293T et réalisé une expérience de dual-luciférase (DLR) en cotransfectant un plasmide contenant une répétition de 10 fois la séquence consensus de fixation de RBPJ qui va permettre la fixation de l'ICN2 couplée avec le gène rapporteur à la luciférase et un plasmide contenant le gène rapporteur Renilla qui sert de contrôle pour la transfection (Résultat supplémentaire 1E). Nous observons une surexpression significative de l'activité de *NOTCH2* comparé à la condition où les cellules 293T sont transfectées avec le vecteur vide (Résultat supplémentaire 1E). J'ai confirmé ces résultats en réalisant un WB avec un anticorps anti-GFP (Résultat supplémentaire 1F). Nous observons qu'il y a une bande à 137 kDa (Résultat supplémentaire 1F). Cette bande correspond à la taille de la fusion protéique. Ces résultats suggèrent donc que le tag GFP n'interfère pas sur l'activité de *NOTCH2* et donc, cette construction peut être utilisée pour effectuer la ChIP. Par la suite, j'ai effectué une infection des cellules Ri-1 avec cette construction. Puis j'ai réalisé la ChIP anti-GFP ainsi que les ChIP sur les marques d'histones telles que H3K4me3 et H3K27ac. Ces derniers permettent d'identifier par exemple, les sites enhancers sur lesquels l'ICN-2 peut se fixer. De plus, cela pourrait nous permettre de voir si le ICN-2 se fixe sur l'enhancer de *MYC*, expliquant ainsi l'induction de *MYC* par *NOTCH2*. J'ai donc séquencé les banques que j'ai fait à partir des échantillons. A partir des données obtenus, nous n'avons pas obtenu de signal pour la ChIP faite avec

l'anticorps anti-GFP. En revanche, nous notons que pour les ChIP faites sur les marques d'histones nous montrent qu'il y a la présence d'un enhancer au niveau du gène *MYC*. Par la suite, nous avons cherché si les différentes régions promotrices et enhancers pouvaient présenter les motifs du gène RBPJ par lequel ICN-2 se fixe.

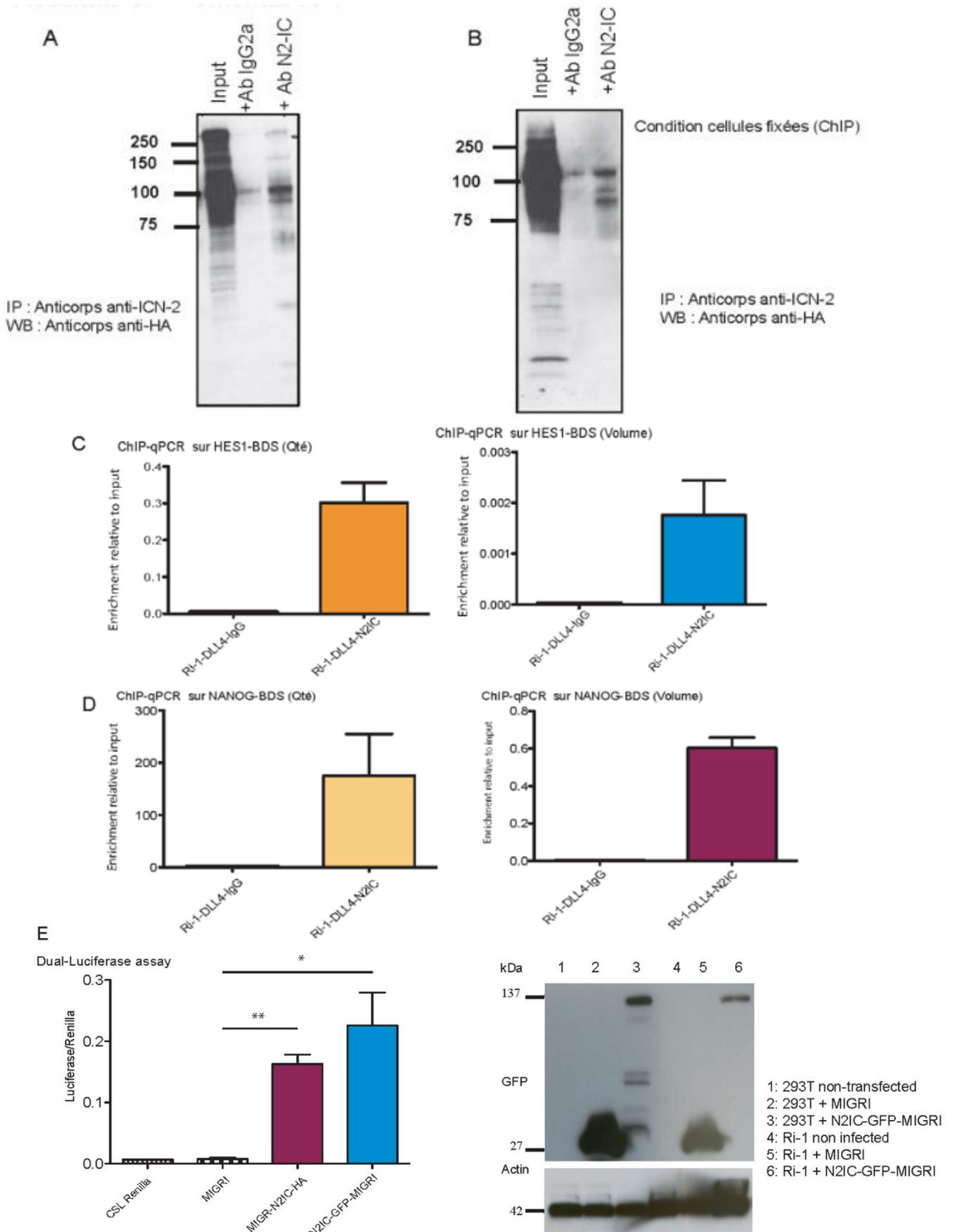
Afin d'optimiser la ChIP, je vais cloner ma fusion protéique dans un plasmide inductible par la doxycycline. Cela me permettrait d'obtenir un plus grand nombre de cellules contenant la fusion protéique pour avoir un meilleur signal sur la ChIP. Cette expérience est en cours de réalisation.

## Résultats supplémentaires 1 : L'identification des sites de fixation de ICN-2 dans les SMZL

(A) Immunoprécipitation (IP) utilisant l'anticorps issue de l'hybridome ICN-2 sur des cellules 293T-N2IC-HA. L'analyse du western blot (WB) a été réalisé avec un anticorps anti-HA. (B) Immunoprécipitation (IP) utilisant l'anticorps issue de l'hybridome ICN-2 sur des cellules 293T contenant la construction ICN2-HA en condition fixée. L'analyse du western blot (WB) a été réalisé avec un anticorps anti-HA. (C) PCR quantitative de l'enrichissement sur les sites de fixation de HES1. Les qPCR ont été réalisés sur les échantillons obtenus de la CHIP sur l'ICN-2 et sur l'IgG dans des cellules Ri-1 stimulées avec les ligands DLL4. Cette qPCR a été réalisée sur des quantités constantes (gauche) et sur des volumes constants (droite) de matériel immunoprécipité. La moyenne des données est représentée et l'écart-type a été calculé par le logiciel GraphPAD PRISM. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'input. (D) PCR quantitative de l'enrichissement sur les sites de fixation de NANOG. Les qPCR ont été réalisés sur les échantillons obtenus de la CHIP sur l'ICN-2 et sur l'IgG dans des cellules Ri-1 stimulées avec les ligands DLL4. Cette qPCR a été réalisée sur des quantités constantes (gauche) et sur des volumes constants (droite) d'ADN. La moyenne des données sont représentée et l'écart-type a été calculé par le logiciel GraphPAD PRISM. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'input. (E) Expérience de dual-luciférase (DLR) sur les cellules 293T transfectées avec les plasmides contenant les 10X-cassettes CSL-luciférase et Renilla, plasmide MiGRI vide, plasmide MiGRI-N2IC-HA et MiGRI-N2IC-GFP. Le signal luciférase est normalisé par rapport au signal Renilla. Les valeurs représentées sont les moyennes calculées sur les valeurs brutes. L'écart-type a été calculé par le logiciel GraphPad PRISM. Un test de Student bilatéral (t-test) a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \*\* p-value  $\leq 0.005$  et \*\*\* p-value  $\leq 0.0005$ . (F) Analyse de WB sur des cellules 293T non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide MiGRI ou avec le vecteur N2IC-GFP-MiGRI et sur des cellules Ri-1 non infectées ou infectées avec un vecteur vide MiGRI ou avec le vecteur N2IC-GFP-MiGRI. Le WB a

été réalisé avec un anticorps primaire anti-GFP puis révélé par un anticorps anti-HRP de lapin et avec un anticorps anti-Actine couplé avec de la HRP. L'actine est utilisée ici comme témoin de charge.

## Résultats supplémentaires 1 : L'identification des sites de fixation de ICN-2 dans les SMZL



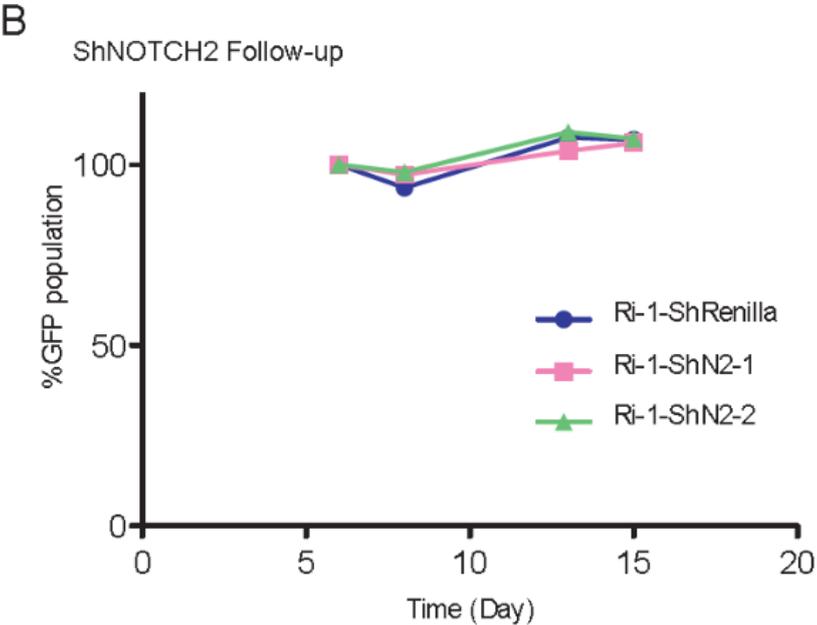
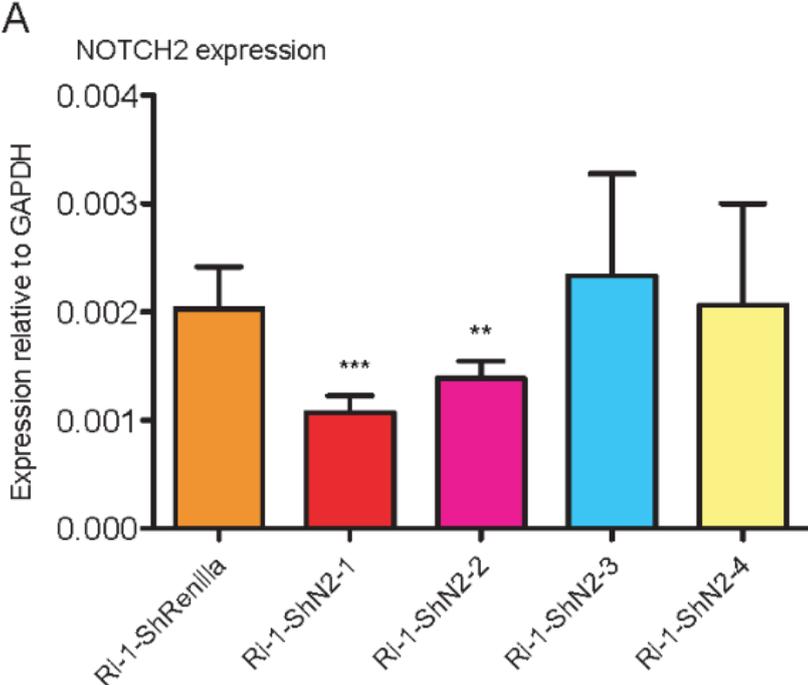
## **II. Déplétion de NOTCH2 dans les cellules Ri-1**

Afin de confirmer de manière génétique que ces cellules expriment *NOTCH2*, j'ai effectué un knockdown de *NOTCH2* en utilisant des shRNAs. J'ai vérifié l'efficacité de ces shRNAs en faisant une qPCR sur le récepteur *NOTCH2*. Nous observons aucune différence significative dans l'expression de *NOTCH2* pour shNOTCH2 numéro 3 et 4. Cependant, les shNOTCH2 1 et 2 diminuent de manière significative l'expression de *NOTCH2* (Résultat supplémentaire 2B). Ainsi, j'ai décidé de faire un suivi tous les deux jours de la survie cellulaire de ces cellules infectées par les shNOTCH2 numéro 1 et 2. Cependant, en suivant la proportion de ces cellules infectées avec les shNOTCH2, nous observons qu'au bout de 15 jours de suivi, il n'y a aucune différence significative de la survie cellulaire entre la condition contrôle et la condition avec la déplétion de *NOTCH2* (Résultat supplémentaire 2B). Ces résultats suggèrent que malgré la déplétion significative de *NOTCH2*, cela ne suffit pas pour avoir une incidence sur la survie cellulaire.

## Résultats supplémentaire 2 : Déplétion de NOTCH2 dans les cellules Ri-1

(A) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *NOTCH2* réalisé sur les cellules Ri-1 infectées avec des vecteurs permettant l'expression de shRNAs ciblant le gène *Renilla* (contrôle) ou *NOTCH2*. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \*\* p-value  $\leq 0.005$ , \*\*\* p-value  $\leq 0.0005$ . (B) Le graphique montre le suivi de la proportion des cellules infectées soit avec un shRNA contrôle (shRenilla) ou soit avec un shRNA ciblant NOTCH2.

Résultats supplémentaire 2 : Déplétion de NOTCH2 dans les cellules Ri-1



### **III. Déplétion de RBPJ dans les cellules Ri-1**

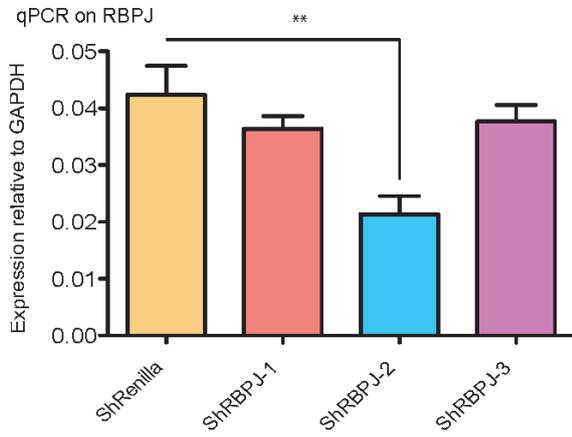
La protéine RBPJ (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region). La protéine *Rbpj* se fixe sur le promoteur. En condition basale, La protéine *Rbpj*, recrute des corépresseurs. Lorsqu'il y a une activation de *NOTCH*, l'ICN se fixe sur la protéine *Rbpj*, ce complexe va entraîner le recrutement de différents coactivateurs, ce qui va permettre la transcription de ces gènes cibles (Kopan R & Llagan MX, 2009). Ainsi, en déplaçant la protéine *Rbpj*, cela empêcherait la fixation de l'ICN et donc une activation de la voie de signalisation *NOTCH*. Afin de vérifier si la déplétion de *RBPJ* a un incidence sur la survie cellulaire, j'ai fait un knockdown de la protéine RBPJ à l'aide de shRNAs dirigés contre la protéine RBPJ. J'ai réalisé une qPCR sur *RBPJ* afin de vérifier l'efficacité de ces shRNAs (Résultat supplémentaire 3A). Nous observons qu'il y a une diminution significative de l'expression de RBPJ pour le shRBPJ-2. Ainsi, j'ai effectué un suivi tous les 2 jours de ces cellules infectées avec le shRBPJ-2 (Résultat supplémentaire 3B). Nous observons que la proportion de cellules infectées par les shRNAs ciblant *RBPJ* ne présente aucune incidence sur la survie cellulaire par rapport aux cellules infectées avec le shRNA ciblant Renilla. Cela suggère que cette diminution de l'expression de RBPJ ne semble pas être suffisant pour avoir un impact sur la survie cellulaire. Nous notons, que les shRNA dirigés contre RBPJ n'agissent pas sur l'expression de *HES1* et donc sur l'activité de *NOTCH* (Résultat supplémentaire 3C). J'ai également voulu voir si cela pouvait également impacter l'expression de *MYC* (Résultat supplémentaire 3D). Nous observons qu'il n'y a aucune différence significative de l'expression de *MYC* dans ces cellules.

### Résultats supplémentaires 3 : Déplétion de RBPJ dans les cellules Ri-1

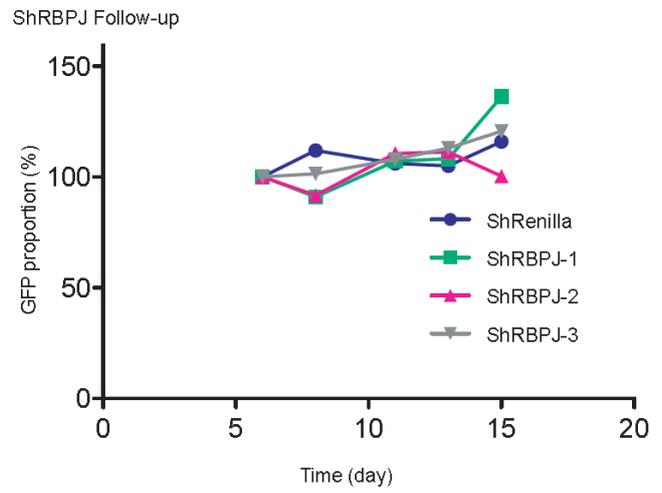
(A) PCR quantitative mesurant l'expression relative de RBPJ réalisée sur les ADNc des cellules Ri-1 infectées avec des shRNAs ciblant le gène de la Renilla (contrôle) ou RBPJ. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . (B) Le graphique montre le suivi de la proportion des cellules infectées soit avec un shRNA ciblant RENILLA ou soit avec un shRNA ciblant RBPJ. Ce suivi a été fait tous les 2 jours. (C) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *HES1* (D) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *MYC*. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH*. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \*\* p-value  $\leq 0.005$ , NS : non significatif.

### Résultats supplémentaires 3 : Déplétion de RBPJ dans les cellules Ri-1

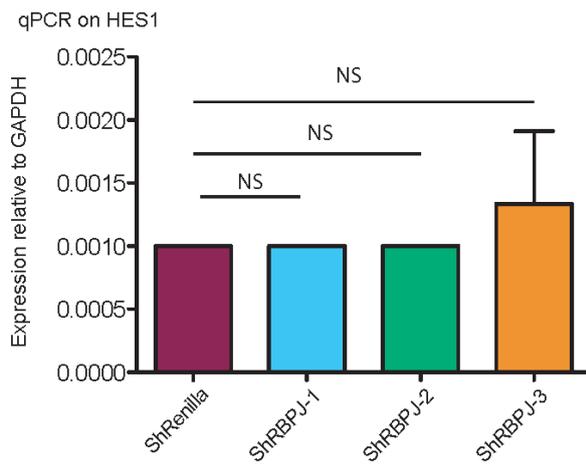
A



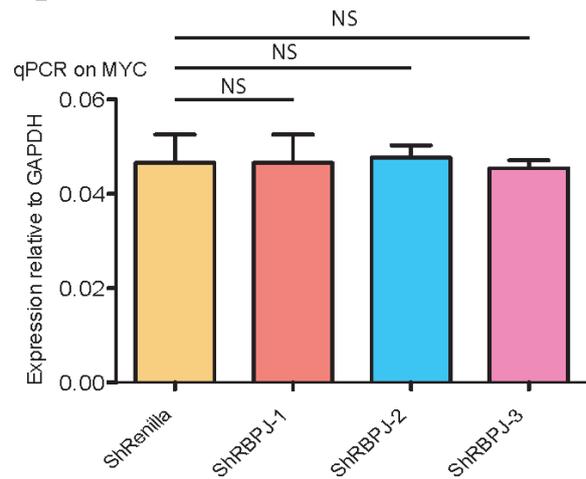
B



C



D



#### **IV. Identification de BCL6 comme un potentiel gène direct de NOTCH2**

Parmi les gènes réprimés significativement par l'inhibition de l'activité gamma-secretase et significativement réexprimés rapidement après élimination de l'inhibiteur par lavage des cellules, j'ai remarqué que le gène *BCL6* en faisait partie. Dans un premier temps, j'ai validé les résultats du RNA-seq (Résultat supplémentaire 3A). Nous observons qu'il y a bien une répression significative de *BCL6* et une réexpression significative de *BCL6* dans la condition wash-off (Résultat supplémentaire 3A). Le gène *BCL6* est un répresseur transcriptionnel qui est requis pour le développement et la maintenance des centres germinaux dans les follicules de la rate (Dent AL et al., 1997) et est connu pour être un oncogène dans les lymphomes B. Le gène *BCL6* réprime l'expression de *NOTCH2* dans la rate afin de permettre la différenciation des cellules B de la rate en cellules B folliculaires (Valls E, Lobry C et al., 2017). Identifier le gène *BCL6* comme étant un potentiel effecteur direct de *NOTCH2* serait donc intéressant.

##### Déplétion de *BCL6* dans les cellules Ri-1 :

Afin de vérifier la fonction biologique de *BCL6* dans ces cellules, j'ai fait un knockdown de *BCL6* dans les cellules Ri-1. J'ai vérifié l'efficacité de déplétion de l'ARNm codant pour *BCL6* induites par ces shRNAs en réalisant une qPCR sur *BCL6* (Résultats supplémentaires 4C). Nous notons qu'il y a une diminution significative de l'expression de *BCL6*. Ainsi, j'ai fait un suivi tous les deux jours de la survie cellulaire (Résultat supplémentaire 4D). Nous observons qu'il n'y a également aucun effet sur la survie cellulaire car nous notons aucune différence significative dans la survie de la proportion de cellules infectées avec les shRNAs ciblant *BCL6* par rapport à celles infectées par shRenilla (Résultats supplémentaires 4D). Malgré ces diminutions significatives de l'expression de *BCL6* obtenues avec ces shRNAs, nous ne notons aucune diminution de la survie cellulaire. Les sh*BCL6* diminuent l'expression de *BCL6* de seulement 50%. Nous pouvons supposer qu'une diminution de l'expression de *BCL6* de moitié n'est pas suffisant pour impacter la survie des cellules Ri-1.

### Traitement avec un inhibiteur de *BCL6*:

En parallèle, j'ai traité les cellules Ri-1 avec un inhibiteur de *BCL6*: FX1. J'ai réalisé et déterminé la concentration de FX1 qui entraîne 50% de mortalité dans les cellules (IC50) (Résultat supplémentaire 5A). Nous notons que le IC50 est proche de 10  $\mu$ M. Nous constatons que le traitement de FX1 entraîne une hausse du taux d'apoptose dès 5 $\mu$ M de FX1 dans les cellules Ri-1 (Résultat supplémentaire 5A). Afin de vérifier si FX1 pouvait avoir un impact sur l'activité de la voie de signalisation *NOTCH*, j'ai réalisé une qPCR sur l'expression de *HES1* sur quelques échantillons de cellules traitées avec FX1 (Résultat supplémentaire 5C). Nous constatons que dès 2 $\mu$ M de FX1, il y a une légère diminution de l'expression de *HES1* (Résultat supplémentaire 5C). Nous pouvons suggérer que l'inhibition de *BCL6* n'influence pas de manière spécifique l'activité de *NOTCH2*. J'ai également fait une qPCR sur *MYC*, nous observons, une légère diminution de l'expression de *MYC* dès 5 $\mu$ M (Résultat supplémentaire 5D). Cette concentration correspondant à une concentration suffisante de FX1 pour induire une apoptose. Ces résultats peuvent suggérer que l'inhibiteur FX1 n'agit pas non plus de manière spécifique sur l'expression *MYC* dû fait d'une légère baisse d'expression non significative. Afin de vérifier l'efficacité de cet inhibiteur à inhiber *BCL6*, je ferai une qPCR sur un des gènes cibles de *BCL6* qui est exprimé dans les cellules Ri-1. Le gène *BCL6* étant un répresseur transcriptionnel, si l'inhibiteur FX1 est efficace, nous observerons donc une activation du gène cible de *BCL6*.

### Expérience de complémentation fonctionnelle :

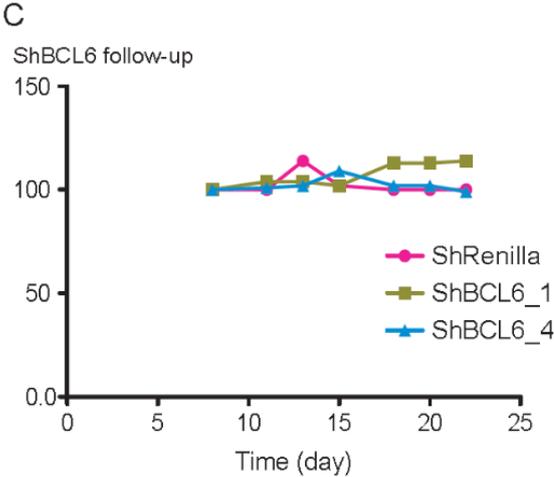
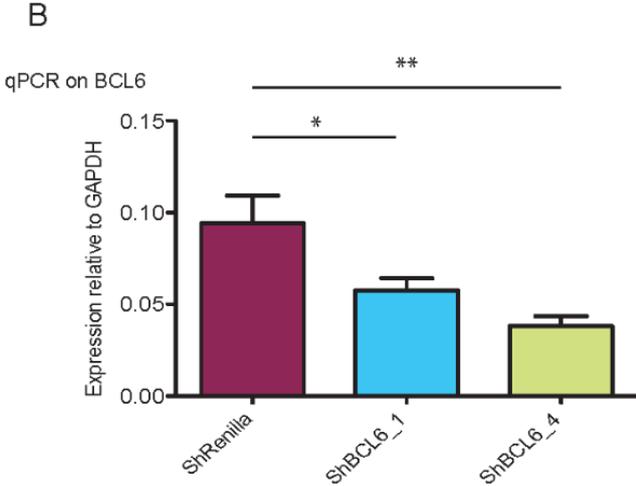
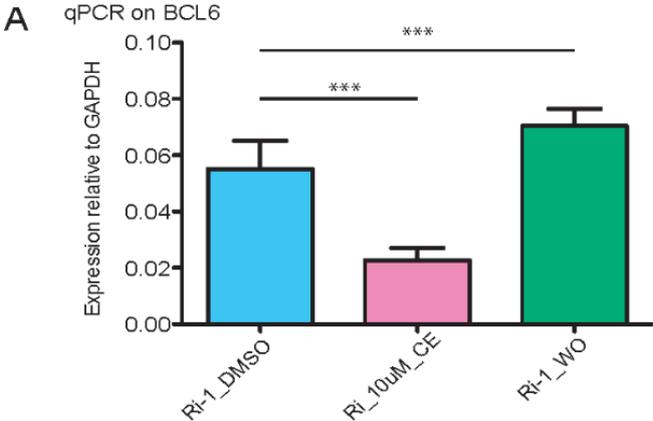
Afin de confirmer les résultats obtenus, j'ai réalisé un CRISPRa sur *BCL6*, où j'ai induit l'expression endogène de *BCL6* indépendante d'une éventuelle induction de son expression par la voie de signalisation *NOTCH*. J'ai analysé le taux d'apoptose dans la condition où l'activité de *NOTCH* est inhibée par un inhibiteur de la gamma-secretase. Nous observons qu'il n'y a aucune restauration de la survie cellulaire dans la condition où l'activité de *NOTCH2* est inhibée (Résultat supplémentaire 6A). J'ai également réalisé

une qPCR sur *BCL6* afin de voir si l'inhibition de *NOTCH2* sur les cellules infectées par SgBCL6 exerce un effet sur l'expression de *BCL6* (Résultat supplémentaires 6). Nous observons que les cellules infectées avec un sgBCL6 présentent une diminution significative de l'expression de *BCL6* lorsque ces cellules sont traitées avec du CompE (Résultat supplémentaires 6). Ces résultats peuvent suggérer les sgRNAs ciblant *BCL6* ne ciblent pas de manière efficace le promoteur de *BCL6* et donc ne permet pas le maintien de l'expression de *BCL6* en présence de GSI. Ainsi, cela ne permet pas une restauration de la survie cellulaire en absence de l'activité de la voie de signalisation *NOTCH* en présence de GSI.

#### Résultats supplémentaires 4 : Inhibition de BCL6 dans les cellules Ri-1.

(A) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *BCL6* réalisée sur les ADNc des cellules Ri-1 traitées avec du DMSO ou avec 10 $\mu$ M de CompE ou avec 10 $\mu$ M de CompE suivi d'un wash-off. (B) Ri-1 infectées avec des shRNAs ciblant le gène de la Renilla (contrôle) ou *BCL6*. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta\text{Ct})}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH*. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \* p-value  $\leq 0.05$ , \*\* p-value  $\leq 0.005$  et \*\*\* p-value  $\leq 0.0005$ . (C) Le graphique montre le suivi de la proportion des cellules infectées soit avec un shRNA ciblant Renilla ou soit avec un shRNA ciblant BCL6. Ce suivi a été fait tous les 2 jours.

**Résultats supplémentaires 4 : Inhibition de BCL6 dans les cellules Ri-1.**

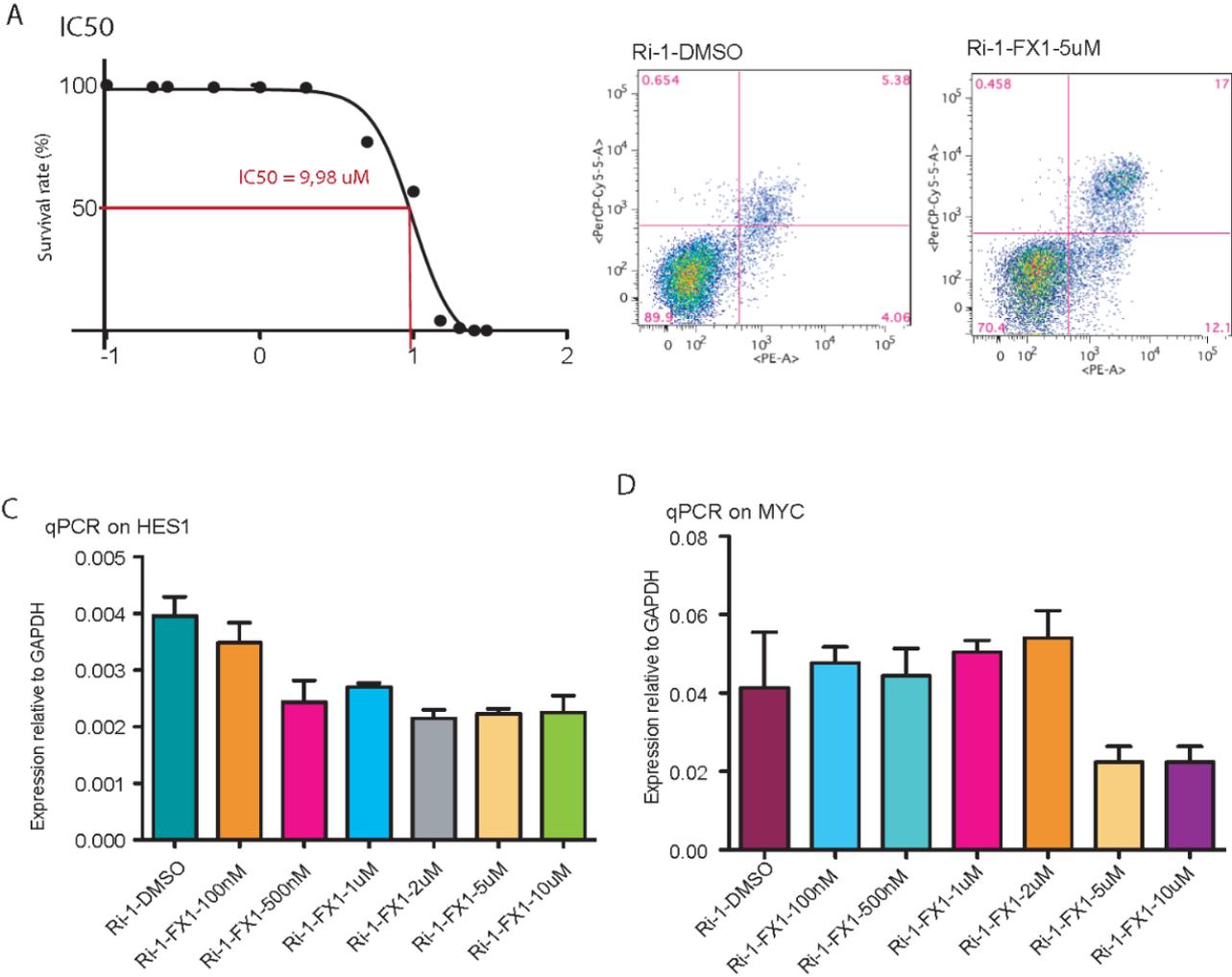


### **Résultats supplémentaires 5 : Inhibition de BCL6 dans les cellules Ri-1 avec un traitement pharmacologique FX1.**

(A) Courbe dose-réponse à l'inhibiteur permet de déterminer l'IC50 de FX1. La détermination de l'IC50 s'est faite par le logiciel GraphPad PRISM. Les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle négatif (DMSO). Les concentrations ont été transformées en log de base 10 sur l'abscisse. L'axe des ordonnées représente le taux de survie des cellules calculées par rapport au taux d'apoptose dans les cellules Ri-1.

(B) FACS plot représentatifs des marquages AnnexinV/7AAD issus de l'analyse de l'apoptose sur les cellules Ri-1 traitées avec du DMSO ou avec 5 $\mu$ M de CompE est représentée sur les FACS plots. (C)(D) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *HES1* (C) de *MYC* (D) réalisée sur les ADNc des cellules Ri-1 traitées avec du DMSO ou avec du FX1. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \*p-value  $\leq 0.05$ , \*\* p-value  $\leq 0.005$  et \*\*\* p-value  $\leq 0.0005$ .

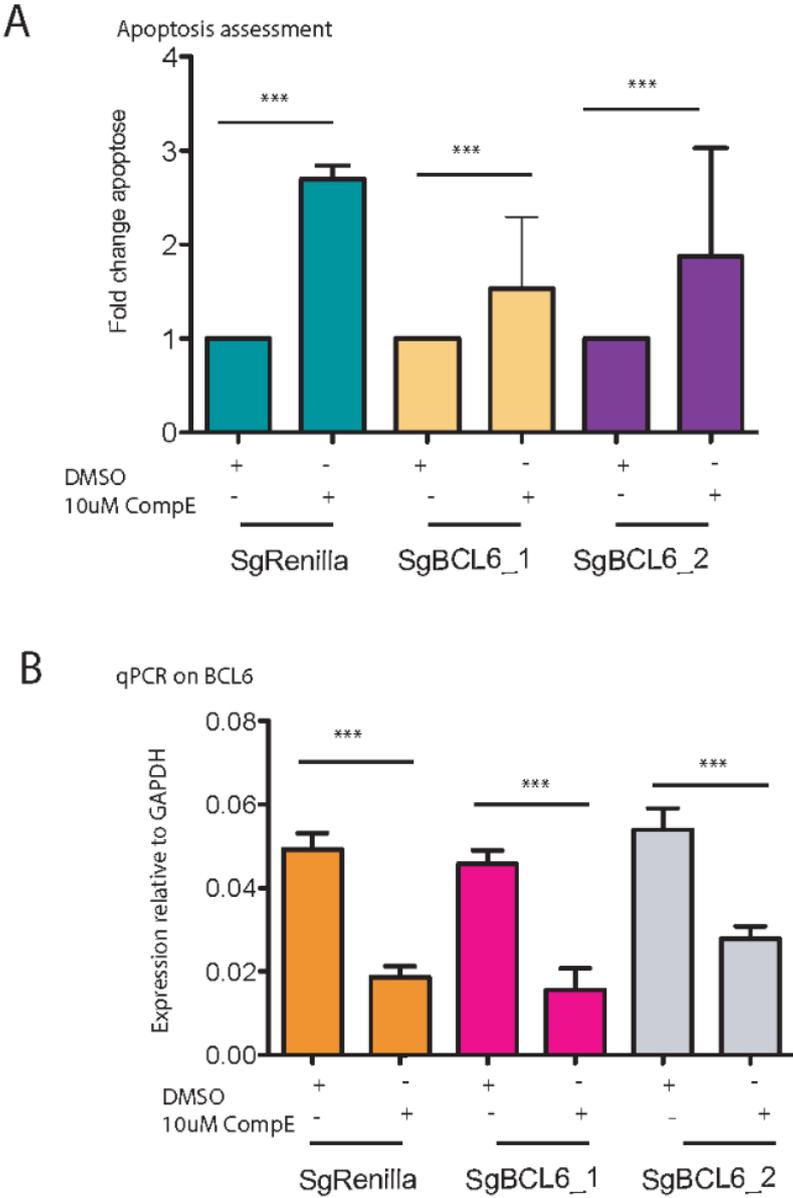
**Résultats supplémentaires 5 : Inhibition de BCL6 dans les cellules Ri-1 avec un traitement pharmacologique FX1.**



## Résultats supplémentaires 6 : Expérience de complémentation fonctionnelle de BCL6.

(A) Analyse d'apoptose des cellules Ri-1 infectées avec les sgRNAs ciblant le gène de la Renilla (contrôle) ou le promoteur de *BCL6* traitées avec DMSO ou avec 10 $\mu$ M de CompE. La proportion d'apoptose a été normalisée par rapport à la condition contrôle : sgRenilla-DMSO. L'axe des abscisses indique les conditions de traitement des cellules. Les valeurs représentées sont des moyennes. Les écart-types ont été calculés par le logiciel GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student (t-test) a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. (B) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *BCL6* réalisée sur les ADNc des cellules Ri-1 infectées avec sgRNAs ciblant le gène de la Renilla (contrôle) ou le promoteur de *BCL6* traitées avec du DMSO ou avec du GSI. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH* et par rapport à la condition contrôle : sgRenilla-DMSO. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux. \*\*\* p-value  $\leq$  0.0005.

**Résultats supplémentaires 6 : Expérience de complémentation fonctionnelle de BCL6.**



## **V. Traitement des cellules Ri-1 avec l'inhibiteur de *BRD4*: JQ1**

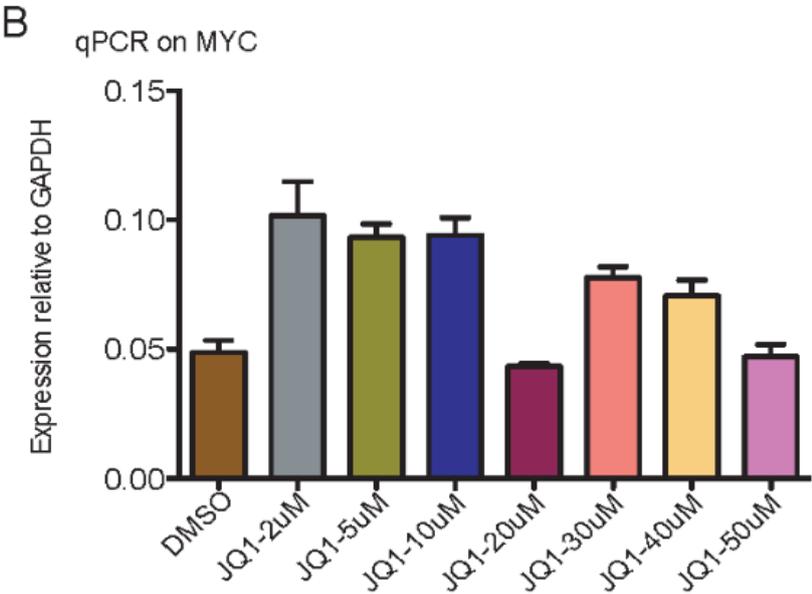
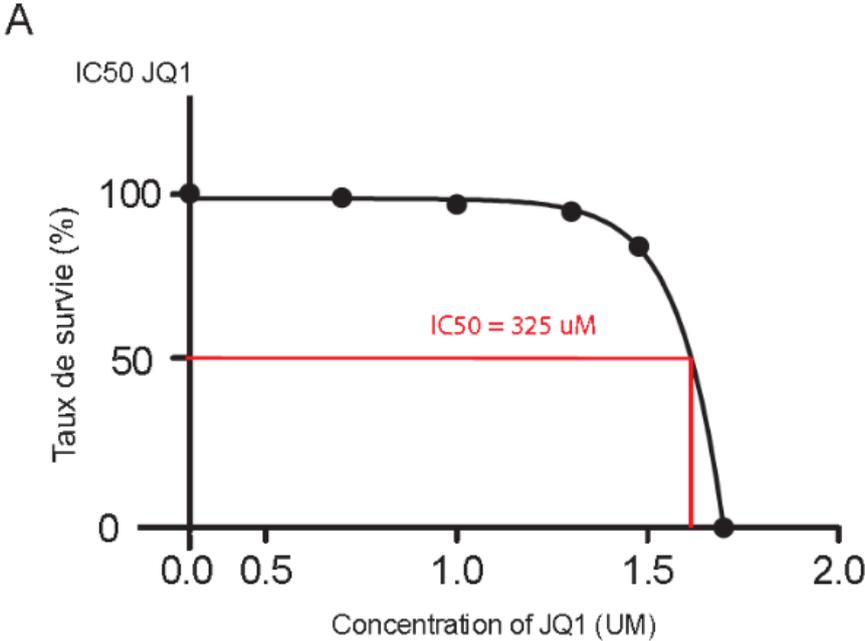
A partir des résultats obtenus sur le rôle biologique de *MYC*, j'ai donc voulu vérifier si le traitement avec un inhibiteur de *MYC* pourrait avoir un effet sur la survie des cellules tumorales. Il n'existe pas d'inhibiteur direct de *MYC*, j'ai donc utilisé un inhibiteur indirect de *MYC*. Il s'agit de l'inhibiteur de *BRD4*: JQ1 (Filippakopoulos et al., 2010, Delmore JE., Issa GC., Lemieux ME., et al., 2012). La protéine BRD4 interagit avec des résidus de lysines acétylées d'histone qui va permettre la transcription au niveau de sites promotrices spécifiques, dont celle de *MYC* (Kanno T., Kanno Y., et al., 2004, Jung M., Philpott M., et al., 2014, Delmore JE., Issa GC., et al., 2012, Dawson MA., Prinjha RK., et al., 2011). J'ai donc voulu établir dans un premier temps, l'IC50 dans les cellules Ri-1 (Résultat supplémentaire 7A). J'ai donc traité les cellules avec les concentrations suivantes : DMSO, 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M et de 50 $\mu$ M. J'ai ensuite analysé le taux d'apoptose en faisant un double marquage : Annexin V et 7AAD. Nous notons que les cellules Ri-1 ne sont pas sensibles au traitement JQ1 car nous observons qu'il n'y a pas d'augmentation significative de la proportion de cellules apoptotiques dans les cellules Ri-1 traitées avec 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M et 10 $\mu$ M de JQ1. Nous constatons que c'est seulement à partir d'une concentration à 20 $\mu$ M qu'il y a une hausse du taux d'apoptose (Résultat supplémentaire 7A). J'ai effectué une qPCR sur *MYC* afin de vérifier si le traitement JQ1 agit au niveau de l'expression de *MYC* (Résultat supplémentaire 7B). De manière surprenante, nous remarquons que le traitement JQ1 induit l'expression de *MYC* (Résultat supplémentaire 7B). Ainsi, ces résultats suggèrent que JQ1 n'a aucun effet sur la survie cellulaire, du fait, d'une induction de *MYC* dans ces cellules.

## Résultats supplémentaires 7 : Traitement des cellules Ri-1 avec l'inhibiteur de BRD4 : JQ1.

(A) Courbe dose-réponse à l'inhibiteur permet de déterminer l'IC50 de JQ1. La détermination de l'IC50 s'est faite par le logiciel GraphPad PRISM. Les valeurs ont été normalisées par rapport au contrôle négatif (DMSO). Les concentrations ont été transformées en log de base 10 sur l'abscisse. L'axe des ordonnées représente le taux de survie des cellules calculées par rapport au taux d'apoptose dans les cellules Ri-1.

(B) PCR quantitative mesurant l'expression relative de *MYC* réalisée sur les ADNc des cellules Ri-1 traitées avec du DMSO ou du JQ1. Les valeurs représentées sont les moyennes des valeurs  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de la *GAPDH*. Les valeurs de l'écart-type ont été calculées par GraphPad PRISM. Un test bilatéral de Student a été réalisé pour comparer les moyennes deux à deux.

Résultats supplémentaires 7 : Traitement des cellules Ri-1 avec l'inhibiteur de BRD4 : JQ1.



## **Matériels & Méthodes : Résultats supplémentaires**

**Hybridome anti-ICN2.** L'hybridome des anticorps monoclonaux dirigé contre ICN-2 (C651-6DbHN) provient du laboratoire du Dr. Spyros Artavanis-Tsakonas disponible sur la base de données DSHB (<https://dshb.biology.uiowa.edu/C651-6DbHN>). Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence (1,5-2 millions cellules / mL). Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu pauvre en SVF (0.1% SVF) pendant 4 jours. La purification des anticorps anti-ICN2 s'est faite par concentration. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube Amicon Ultra-15 dont les pores de la membrane limitent les protéines au-dessus de 10 kDa de chez Millipore. Le surnageant a été centrifugé pendant 30 minutes à 3700 rpm à 4°C. Nous récoltons le volume mort dans la membrane pour récolter les anticorps anti-ICN2.

**Western Blot (WB).** Les WB sont réalisés avec 80µg de protéines qui ont été extraites par un tampon de lyse contenant : 50mM de Tris-HCl, 2mM de EDTA, 150mM de NaCl, 1% de NP40, qsp H<sub>2</sub>O). La migration des protéines ont été effectuée sur des gels BioRad pré-coulés. Le tampon de migration a été fait à partir de 25 mM de Tris-base, 190 mM de glycine, de 0,1% de SDS et d'eau. Les protéines ont été transférées sur une membrane en PVDF par la machine BioRad, programme « high molecular weight ». Les anticorps utilisés sont ceux produits par l'hybridome ICN-2 (5ug), 2ug anticorps anti-Actine (Sigma : A1978) 2ug anticorps anti-Ig2a de souris (SCBT : sc-69917), 2ug anticorps anti-GFP (Cell Signaling : 2956S). Les protéines qui ont été incubées avec les anticorps primaires ICN-2, IgG ont été incubés par des anticorps secondaires anti-HRP de souris. Pour l'anticorps primaire anti-GFP a été incubé avec un anticorps secondaire anti-HRP de lapin. Les WB ont été révélés avec le kit ECL : SuperSignal™ West PICO PLUS, chemiluminescent substrate (ref : 34580, Thermo Scientific). Les membranes ont été incubées avec les réactifs pendant 5min et ont été révélés en chambre noire avec un développeur de film d'autoradiographie (ECL Amersham Hyperfilm, GE Healthcare Life Sciences).

**Immunoprécipitation (IP).** Pour l'IP, les cellules 293T-N2IC-HA ont été lysé avec le tampon de lyse utilisé pour le WB. Nous avons utilisé 50ug de protéines. Pour la condition ChIP, les cellules 293T-N2IC-HA ont été fixées avec 1% de formaldhéhyde. Les cellules ont été lysé avec un tampon de lyse cellulaire (5mM HEPES pH 8.0, 85mM KCL, 0,5% NP40, inhibiteur de la protéase, ici Complete, qsp H2O) pendant 10 minutes dans la glace puis nous avons réalisé une lyse du noyau avec un tampon de lyse nucléaire (50mM Tris-HCL pH 8.1, 10mM EDTA, pH 8, 1% SDS, Complete, qsp H2O). Le culot a été soniqué par le Bioruptor Pico, avec un cycle de sonication de 5 minutes (30'' on / 30'' off). Les ChIP, l'IP ont été incubé toute la nuit à 4°C avec 3ug d'anticorps anti-ICN2 ou 3ug d'anticorps anti-IgG2a et avec 30uL de protéine G. Pour la ChIP, 3 lavages successifs ont été réalisé dans l'ordre suivant : Low salt (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-Cl, pH 8.1, 150mM NaCl), High salt (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-Cl, pH 8.1, 500mM NaCl) et LiCl (10mM Tris-Cl, pH 8, 250 mM LiCl, 1% NP40, 1% Na deoxycholate, 1mM EDTA). L'élution s'est faite avec le tampon suivant : 100mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS). Pour les échantillons d'IP et de ChIP ont été dénaturés à 95°C. Puis, nous avons réalisé un WB avec l'anticorps anti-HA.

**CUT&RUN.** Le protocole qui a été utilisé provient de l'article publié par le Dr. Henikoff Steven (Janssens D., et Henikoff S., 2017). 2 millions de cellules ont été utilisées pour cette expérience. Les recettes des différents tampons proviennent également du protocole.

**Stimulation des cellules Ri-1 avec Dll4.** Les cellules Ri-1 utilisées ont été induites par stimulation de ligands DLL4 produits par les cellules OP9. 1 millions de cellules OP9-Dll4 ont été semées dans des plaques 6 puits. 2 millions de cellules Ri-1 ont été mises en culture avec les cellules OP9-DLL4. Les cellules Ri-1 induites ont été récoltées le lendemain matin. Ces cellules OP9-Dll4 ont été réalisées par le Dr. Camille Lobry.

**ChIP qPCR.** Les qPCR ont été réalisés soit à volume constant soit à quantité constante des ADNs sur les sites de fixation de *NANOG* et *HES1*. Les réactifs proviennent du kit Promega (Tableau 1).

**Dual Luciferase Assay (DLR).** L'activité de la luciférase a été réalisée avec le kit Promega Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E1910). Nous avons réalisé une co-transfection sur des cellules 293T de plasmides : (0.5 µg) le plasmide d'intérêt (N2IC-GFP-MigRI), (0.5µg) le plasmide contenant un promoteur minimum et (50ng) le gène rapporteur Renilla et le plasmide cloné par le Dr. Camille Lobry dans le plasmide promega basic pGL-3, contenant une construction avec la séquence consensus TGTGGAAC de RBPJ répétée 10 fois afin de permettre la liaison du ICN2. Le gène Renilla ici, est transfectée 10 fois moins de fois car il est utilisé comme contrôle de transfection.

**Transfection.** La transfection a été réalisée sur des cellules 293T qui ont été semées à semi-confluence (0.15 million de cellules / puit dans une plaque 12 puits et 0.3 millions de cellules / puit dans une plaque 6 puits). Pour le DLR, 0.5µg des plasmides : MigRI-N2IC-GFP, MigRI-seul, MigRI-N2IC-HA. Pour la transfection faite pour le DLR : voir la rubrique DLR.

**Fusion Protéine N2IC-GFP.** La fusion de la protéine du ICN-2 et de la protéine GFP ont été réalisées avec la technique du clonage Golden Gate. Le clonage du golden gate s'est faite avec le programme suivant : 37°C 5', 16°C 10', 50°C 5', 80°C 5') et les quantités suivantes : 150ng de vecteur receveur PcDNA, 150 ng de chaque insert (N2IC et GFP). L'enzyme de restriction utilisé ici est le BsmBI (1 unité). Le premier clonage s'est fait avec du Xgal (Sigma : 3117073001) (2µg/mL) / IPTG (Sigma : I6758) (10µg/mL). Les colonies blanches ont été sélectionnées puis l'extraction d'ADN s'est faite par un kit de miniprep (E.Z.N.A® Plasmid Isolation Kits, Omega-Bio-Tek VWR). La fusion protéique a été clonée dans un plasmide rétroviral MigRI. Les primers utilisés sont présentés dans le tableau 3.

**ChIP.** La ChIP a été réalisé sur un culot de 1 million de cellules. Le protocole utilisé pour cette ChIP correspond au protocole livré avec le kit Diagenode (iDeal ChIP-seq kit for Histones x100, cat. C01010059). Les cellules ont été soniquées par la machine Bioruptor Pico avec un cycle de sonication de 10 minutes (30" on / 30" off). Nous avons utilisé 2µg d'anticorps pour chaque condition : anti-H3K4me3 et anti-H3K27ac viennent de chez Diagenode. L'anticorps anti-GFP Dynabeads est couplé à des billes de protéines A et provient de Chromatek. L'élution, l'extraction et la purification de l'ADN ont été réalisé avec le protocole et le kit Diagenode.

**Banque ChIP.** La banque a été fait sur 2ng d'ADN de chaque échantillon. Nous avons réalisé une réaction de « end repair » en utilisant les réactifs suivants : 2ng d'ADN, T4 DNA buffer 10x avec ATP (NEB M0202S), 10mM de dNTP, : T4 DNA ligase (NEB M0202S), T4 PNK (M0236S) pendant 30 minutes. Nous avons ensuite fais une étape de purification par billes Ampure XP (1.8X). Une réaction dA-tailing a été réalisée avec les réactifs suivants : 10µL d'ADN, NEB buffer 2, 10mM dATP, klenow 3'-5' exo-) Cette réaction s'est faite à 20°C pendant 30 minutes. Une autre étape de purification a également été faite avec des billes Ampure XP (1.8X). Par la suite, nous avons ligué les ADN avec des adaptateurs : 1µM et T4 DNA ligase pendant 30 minutes à température ambiante. Nous avons ensuite effectué une sélection de tailles avec 3 étapes de purification par les billes Ampure XP : 1.4X, 0.5X et 1X. Nous avons effectué une qPCR afin de vérifier le nombre de cycles requis pour amplifier le fragment. La qPCR a été faite avec les primers suivants : P5seq (5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCT-3') et P7seq (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAG - 3') et le réactif Kapa SYBR fast 2X. Le programme qPCR utilisé est le suivant : 1 minute à 95°C puis 45 cycles de 10 secondes à 95°C et 10 secondes à 60°C. Puis nous avons fait 16 cycles de PCR pour amplifier les fragments. Nous avons utilisé le Kapa HiFi ready mix. Les primers utilisés sont Truseq 1.1 (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGAT-3') Truseq 2.1 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'). Le programme utilisé est : 2 minutes à 98°C puis 16 cycles de 30 secondes à 98°C, 30 secondes 58°C et 30 secondes à 72°C. Après la

réaction d'amplification, deux étapes de purification par les billes d'ampure XP a été réalisées (1X). Les ADNs sont quantifiés avec le kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermofisher).

**shRNA knockdown.** Le design des ShRNAs ciblant NOTCH2, BCL6 et RBPJ a été réalisé avec l'outil SPLASH (Pelosof et al., 2017) (Tableau 2). Les oligonucléotides ont été synthétisés et commandés sous forme de 97 mers. Les shRNA ont été amplifiés par PCR en utilisant les oligos de 97-mers et en utilisant les primers suivants : miRE-Xho-fwd (5'-TGAAC TCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG-3) and miRE-EcoOligo-rev (5'-TCTCGAATTCTAGCCCCTGAAGTCCGAGGCAGTAGGC-3). Les shRNAs ont été clonés dans le vector SGEP (Fellmann et al Cell reports 2013, AddGene #111170) en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XhoI. Les shRNAs clonés ont été vérifiés par séquençage Sanger (Eurofins).

**RT-qPCR.** Les ARNs ont été extraits avec le kit Omega Bio-Tek E.Z.N.A® Total RNA kit I. Le protocole utilisé correspondant au protocole donné avec le kit. 1µg d'ARN a été utilisé pour synthétiser les cDNAs. La rétrotranscription a été faite avec le kit de rétrotranscription : High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher). La qPCR a été réalisée en utilisant le kit SYBR green PCR (Promega, GoTaq® qPCR Master). La machine utilisée pour faire la qPCR est le QuantStudio 6 and 7 Flex (Thermofisher). Les primers utilisés pour cette qPCR sont résumés dans le tableau 4.

**IC50.** L'inhibiteur FX1 a été créé et synthétisé par le laboratoire du Dr. Melnick AM (Cardenas MG., Yu W., Beguelin et al., 2016). L'inhibiteur FX1 a été acheté chez Sigma-Aldrich. L'inhibiteur a été re-suspendu dans du DMSO afin d'atteindre une concentration stock de 10mM (SML2074-5MG). L'IC50 a été évalué par apoptose par marquage avec du 7AAD et AnnexinV. Le taux de survie a été calculé : (100-% proportion de cellules apoptotiques). Les taux de survies ont été normalisés par rapport au contrôle (DMSO). Les valeurs en abscisse ont été transformées sous forme de Log

de base 10 par le logiciel GraphPad PRISM. L'IC50 a été calculé par ce programme. La réalisation de l'IC50 de JQ1 a été réalisée de la même façon.

**CRISPRa.** Les guides ARNs *BCL6* ciblent entre les régions -300 à +500 pb autour du TSS (=Transcription Start Site) de *BCL6* ont été générées par E-CRISP (Heigwer et al., 2014). Les guides ciblant *BCL6* et le guide control *RENILLA* ont été clonés dans un plasmide lentiviral : pLV-hU6-sgRNA-hUbc-dCAS9-VP64-T2a-GFP. Les séquences sont présentées dans le tableau 5. Les cellules Ri-1 ont été infectées avec ces différents sgRNAs.

**Apoptose.** Les cellules infectées avec les différents guides ont été récoltées et marquées avec du 7AAD et de l'AnnexinV appartenant au kit : BD Pharmigen PE Annexin V Apoptosis Detection kit. L'analyse a été réalisé par cytométrie en flux Canto X et les résultats brutes ont été analysés avec le logiciel FlowJo v9.

HES1_BDS_FWD	5'- CGTGTCTCCTCCTCCATT -3'
HES1_BDS_REV	5'-GGCTCTATATATATCTGGGACTGC -3'
NANOG_BDS_FWD	5'- TCAGCTTGTGTGGGAGCAAA -3'
NANOG_BDS_REV	5'- TGA CTCATTCTCCTCTGCACTC

**Tableau 1** : Les séquences des primers utilisés pour faire la ChIP-qPCR.

shRenilla	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCGTGCCAATAAGTACATGGTAATAGTGAAGCCACAGATGT ATTACCATGTA CT TATTGGCACATGCCTACTGCCTCGGA -3'
shNOTCH2	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGACCCAATGTCTCTTGACATATAGTGAAGCCACAGATGTA TATGTCACAAGAGACATTGGGCTGCCTACTGCCTCGGA -3'
shRBPJ-1	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGACAGAACATCATTGTAATCTTATAGTGAAGCCACAGATGTA TAAGATTACAATGATGTTCTGGTGCCTACTGCCTCGGA -3'
shRBPJ-2	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGACGTAAGATAATTGAAATATTATAGTGAAGCCACAGATGT ATAATATTTCAATTATCTTACGGTGCCTACTGCCTCGGA -3'

shRBPJ-3	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGACACGTGTGTAATGTTATAACAATAGTGAAGCCACAGATGT ATTGTATAACATTACACACGTGGTGCCTACTGCCTCGGA -3'
shRBPJ-4	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGAAGATAGTTGTAAGATTATAAATAGTGAAGCCACAGATGT ATTTATAATCTTACAACCTATCTGTGCCTACTGCCTCGGA -3'
shRBPJ-5	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGAACAGACTTATCTGCAATCATATAGTGAAGCCACAGATGT ATATGATTGCAGATAAGTCTGTGTGCCTACTGCCTCGGA -3'
shBCL6_1	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGCAGAGTTGTAATATATAATAGTGAAGCCACAGATGT ATTATATATTTACAACCTCTGCCATGCCTACTGCCTCGGA - 3'
shBCL6_2	5' - TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGTGAAGTTTACAATTTATAGTGAAGCCACAGATGT ATAAATTGTAACCTTCACTTGCTGCCTACTGCCTCGGA - 3'

**Tableau 2 :** Les séquences des shRNAs utilisés pour les différentes expériences de knockdown.

N2IC_eco_FWD	5'ACAGCCTCGTCTCCCGTTAATTAATTAAGTGTACAGCTCGTCC -3'
GFP_pac_REV	5' ACAGCCTCGTCTCCCCCTGAATTCATGGCAAACGAAAGCGT -3'

**Tableau 3 :** Les séquences des primers utilisés pour faire le clonage Golden Gate pour obtenir la fusion N2IC-GFP.

NOTCH2_FWD	5'-GGTGGCAGAACTGATCAACTGC - 3'
NOTCH2_REV	5'- GTTGCCTGCATGTCTCGGTTG - 3'
BCL6_FWD	5'- GTGAAATCTGTGGCACCCGTTT -3'
BCL6_REV	5'- TGGCTTTTGTGACGGAAATGCA - 3'
RBPJ_FWD	5'- AGAGCCTTCAGTTGAATGGCG - 3'
RBPJ_REV	5'- TCTCTCCACACCTGTACATA - 3'

**Tableau 4 :** Les séquences des primers utilisés pour faire les qPCR. Les primers de MYC, GAPDH et HES1 sont les mêmes que ceux utilisés dans la partie Matériels & Méthodes du chapitre « Résultats ».

sgBCL6-1_FWD	5'- GAGGGAGTCAGACGCAGGCC - 3'
sgBCL6-1_REV	5' - GGCCTGCGTCTGACTCCCTC - 3'
sgBCL6-2_FWD	5'- GAGCTGAGGGAGTCAGACGC - 3'
sgBCL6-2_REV	5' - GCGTCTGACTCCCTCAGCTC - 3'

**Tableau 5 :** Les séquences des guides ARNs BCL6 utilisés pour le CRISPRa.

# DISCUSSION

## I. Les cellules Ri-1 présentent une activité constitutive de NOTCH

Tout au long de ma thèse, j'ai donc cherché à identifier les gènes cibles directs de *NOTCH2* induits dans la lignée cellulaire SMZL : Ri-1. Dans un premier temps, j'ai caractérisé la lignée cellulaire SMZL Ri-1. C'est la seule lignée cellulaire SMZL qui possède la mutation spécifique de *NOTCH2* retrouvée chez les patients SMZL (figure supplémentaire 1A). De plus, j'ai également montré par qPCR et RNA-seq que celles-ci exprimaient en majorité le récepteur *NOTCH2* (Figure 1A, article, Figure supplémentaire 1B). Cependant, en analysant les valeurs d'expression des différents récepteurs NOTCH obtenus par l'expérience de RNA-seq, nous remarquons qu'il y a une légère expression de *NOTCH1* (Figure 1B, article). Nous avons donc vérifié et montré qu'il n'y avait aucune activité de *NOTCH1* dans ces cellules en réalisant un WB avec un anticorps anti ICN-1 (Figure supplémentaire 1C). Nous avons également montré que cette lignée cellulaire présente une activation constitutive de *NOTCH* (Figure 1C, article) et est également dépendante de la voie de signalisation NOTCH (Figure 1D, article). En effet, lorsque l'on traite les cellules Ri-1 avec un GSI, nous avons observé une augmentation du taux d'apoptose dans ces cellules. Le GSI comme mentionné dans l'introduction, peut avoir d'autres cibles que les récepteurs NOTCH. Ainsi, afin de vérifier si les différents substrats identifiés du GSI sont exprimés dans les cellules Ri-1, j'ai interrogé les données issues du séquençage d'ARNs. Ainsi, à partir de ces données, nous n'avons observé aucune expression des différents substrats du GSI. Nous en déduisons que l'inhibition par le traitement GSI passe par les récepteurs NOTCH. Afin de vérifier dans les cellules Ri-1 si l'expression de *NOTCH2* est essentielle à la survie cellulaire ainsi qu'à l'induction de l'expression de *HES1* et de *MYC*, j'ai fait un knockdown de celui-ci en utilisant des shRNA dirigés contre *NOTCH2* (Résultats supplémentaire 1A). Cependant, les shRNA dirigés contre *NOTCH2* ne sont pas

suffisamment efficaces pour entraîner une diminution de la survie cellulaire. Nous n'avons observé aucune différence entre les shRNA contrôle (shRenilla) et les shRNA dirigés contre *NOTCH2* (Résultat supplémentaire A). Nous pouvons supposer que les knockdown de shRNA ne sont pas suffisamment importants pour diminuer la survie cellulaire des cellules Ri-1, du fait, d'un signal d'activation de *NOTCH2* assez conséquent. Les shNOTCH2 diminuent l'expression de *NOTCH2* de manière significative, nous pouvons également vérifier l'expression de *HES1* afin de voir si ces shNOTCH2 peuvent avoir une incidence sur l'activité de *NOTCH2*.

Nous avons vu qu'il n'y avait aucune activité basale de *NOTCH1* dans ces cellules (Figure supplémentaire 1C). Cependant, nous avons remarqué qu'il y avait une expression basale de *NOTCH1* qui est inférieure par rapport à celle de *NOTCH2* (Figure 1B). Nous pouvons supposer qu'en absence de *NOTCH2*, il pourrait avoir une redondance de l'activité de *NOTCH* via une activation de la voie de signalisation *NOTCH1*. Dans un premier lieu, pour vérifier cela, nous pouvons réaliser une qPCR sur *NOTCH1* dans les cellules infectées avec le shNOTCH2. Cela permettrait de voir s'il y a une hausse de l'expression de *NOTCH1* au niveau transcriptionnel. Nous pouvons réaliser une qPCR sur *HES1* afin de quantifier l'activité de voie de signalisation NOTCH induit par *NOTCH1*. Puis, nous pouvons également faire un WB avec un anticorps anti-ICN-1. Cela permettrait de détecter la présence d'une activité de *NOTCH1*, en absence de *NOTCH2* dans ces cellules. Nous pourrions aussi envisager de réaliser un double knockdown de *NOTCH1* et *NOTCH2* avec la technique du CRISPR interference ou CRISPRi. A partir de ce double knockdown, nous analyserons les expressions de *HES1* ainsi que les effets sur la survie. Nous avons donc observé que le knockdown de *NOTCH2* par ARN interférence n'était pas fonctionnel. J'ai donc voulu effectuer un knockout en utilisant la technologie du CRISPR/Cas9. J'ai donc infecté mes cellules avec des guides ARN dirigés contre NOTCH2 afin d'obtenir une insertion ou une délétion au niveau de la séquence d'ADN qui entraînera par la suite un décalage du cadre de lecture aboutissant à l'introduction d'un codon stop prématuré. Ce codon stop

prématuré entraîne l'absence d'expression protéique ou une dégradation par le mécanisme du « nonsense mediated decay ». Cependant, j'ai rencontré deux problèmes lors de cette expérience. La première difficulté était l'infection des guides dans les cellules Ri-1. A chaque tentative, le taux d'infection n'était que de 1 à 2%. Ces faibles taux d'infection rendent l'étude sur le suivi de la prolifération cellulaire difficile. La deuxième difficulté rencontrée était que, du peu de cellules infectées obtenues, j'ai extrait l'ADN génomique puis amplifié par PCR et séquencé par la méthode de Sanger afin de vérifier qu'une mutation s'était bien produit au niveau de la séquence cible. Les résultats du séquençage ont montré qu'il n'y avait aucune insertion ou délétion observée au niveau de la région cible. Nous avons supposé que ces guides n'étaient pas efficaces pour induire un knockout de *NOTCH2*.

En parallèle, j'ai aussi fait une déplétion de *RBPJ* (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region). La protéine *Rbpj* se fixe sur l'ADN. En condition basale, La protéine *Rbpj*, recrute des corépresseurs. Lorsqu'il y a une activation de *NOTCH*, l'ICN se fixe sur la protéine *Rbpj*, ce complexe va entraîner le recrutement de différents coactivateurs, ce qui va permettre la transcription de ses gènes cibles (Kopan R & Llagan MX, 2009). Ainsi, en inhibant l'expression de *RBPJ*, cela empêcherait la fixation de l'ICN et donc une activation de la voie de signalisation *NOTCH*. J'ai donc fait un knockdown en infectant les cellules avec des shRNAs ciblant *RBPJ*. Lorsque nous avons fait un suivi de la proportion de cellules infectées par le shRBPJ-2, nous avons observé qu'il n'y a aucun impact sur la survie cellulaire (Résultats supplémentaires 3). Ce knockdown de 50% n'est donc pas suffisant pour avoir une incidence sur la survie et la prolifération cellulaires. Nous observons également, qu'il n'y a aucun effet sur les expressions de *HES1* (Résultat supplémentaire 3C). Ainsi, cela suggère que les shRNAs ciblant *RBPJ* n'affectent pas l'activité de *NOTCH2* dans ces cellules. Ces shRBPJ ne sont pas suffisant pour avoir un effet sur l'activité de la voie de signalisation *NOTCH*. J'ai réalisé une qPCR sur l'expression de *MYC* avec les shRBPJ, nous remarquons qu'il n'y aucun effet sur l'expression de *MYC* (Résultat supplémentaire 3D).

Ainsi, nous pourrions envisager de réaliser un CRISPRi dirigé contre le récepteur NOTCH2 et également réaliser un blocage de l'activation du récepteur NOTCH2 à l'aide d'un anticorps bloquant dirigé contre le récepteur NOTCH2.

Bien que les expériences génétiques effectuées sur ces cellules n'aient pas abouti, j'ai quand même pris la décision, à partir des résultats obtenus, de continuer avec ce modèle cellulaire *ex vivo*. En effet, cette lignée cellulaire, après caractérisation, présente des caractéristiques propres aux patient mutés pour *NOTCH2*. Les résultats obtenus semblent nous montrer que d'une part, cette lignée cellulaire semble ne pas activer la voie de signalisation *NOTCH1* et que d'autre part, les cellules Ri-1 ont une activité basale constitutive qui peut être inhibée par un traitement GSI. De plus, nous avons observé un impact au niveau des changements transcriptionnels et également au niveau de la survie cellulaire. Nous supposons donc que l'activité constitutive que l'on observe semble être induite par l'activation de la voie *NOTCH2*.

## **II. L'identification de l'oncogène *MYC* comme un gène induit par *NOTCH***

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'identification du transcriptome de *NOTCH*, plus précisément, aux changements transcriptionnels induits par *NOTCH* dans ces cellules. Dans un premier temps, j'ai établis les trois conditions suivantes (Figure 2 A, article, Figure supplémentaire 2C) :

- Ri-1 traitées avec du DMSO correspondant à la condition contrôle
- Ri-1 traitées avec 10  $\mu$ M de CompE : cette condition permet de voir les gènes induits significativement réprimés par l'absence de l'activité de *NOTCH*
- Ri-1 traitées avec 10  $\mu$ M de CompE et lavées (« wash-off ») pendant un temps court (2h) : cette condition permet une réactivation rapide de la machine transcriptionnelle à un instant t.

J'ai ensuite séquencé les différents ARNs. Les données d'analyses d'expression génique différentielle, nous ont permis de réduire la liste des gènes potentiellement directs de *NOTCH* à 728 gènes significativement réexprimés en condition wash-off (Figure 2A, article). A partir de ces données, j'ai par la suite voulu vérifier si ces 728 gènes étaient

impliqués dans de grandes voies de signalisation. Pour ce faire, j'ai réalisé une analyse de GSEA. Nous avons remarqué qu'il y a un enrichissement de gene sets composés de cibles transcriptionnelles de *MYC*. Les gene sets composés de cibles de *MYC* sont réprimés dans les conditions traitées avec du GSI et sont réexprimés dans la condition (Figure 2B-C, article). Le gène *MYC* est un oncogène clé dans de nombreux types de cancers, notamment dans les leucémies et les lymphomes. Nous avons également confirmé que le gène *MYC* suit le même profil d'inhibition en condition GSI et de réexpression en condition wash-off (Figure 2D, article). L'identification de *MYC* parmi les gènes réexprimés dans la condition « wash-off » est pertinent dans la mesure où, il a été montré que *MYC* est régulé par *NOTCH1* dans les leucémies aiguës T (Palomero T et al., 2006, Weng AP et al., 2006). Cela indiquerait donc que *NOTCH2* pourrait partager certains gènes cibles communs avec *NOTCH1* dans les LAL-T. Cela peut s'expliquer par le fait que *NOTCH1* et *NOTCH2* ne se fixent pas directement à l'ADN mais se fixent sur une séquence consensus de la protéine RBPJ et donc activer des gènes cibles communs à de grandes voies de signalisation.

De nombreuses études ont également permis de montrer que l'expression aberrante de *MYC* est retrouvée dans certains lymphomes B (Kridel R., et al., 2012, Palmedo et al., 2007).

Ces différents travaux ont mis en évidence que la régulation de l'expression de *MYC* par l'expression de *NOTCH1* se fait via la fixation de l'ICN1 au niveau d'un enhancer de *MYC*. Cet enhancer de *MYC* sur lequel se fixe l'ICN dans les lymphomes B est appelé B-NDME pour « B-cell NOTCH MYC Dependent Enhancer » (Lancho O et Herranz D, 2018). J'ai réalisé une immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage haut débit (ChIP-seq) avec des anticorps dirigés contre les modifications post-traductionnelles des queues d'histones telles que : la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) qui est enrichi au niveau des promoteurs bivalents et des promoteurs activement transcrits et l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27ac) qui est enrichi au niveau des enhancer et des promoteurs activement

transcrits. En analysant ces données au niveau du locus de *MYC* et en comparant avec des données publiées sur des lymphomes B possédant une mutation activatrice de *NOTCH1* (Ryan RJH et al., 2017), nous avons identifié le B-NMDE. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la régulation de l'expression de *MYC* se fait via une fixation de l'ICN2 sur ce même enhancer.

Ainsi, cela pourrait nous donner un indice sur une activation d'une expression aberrante de *MYC* dans la pathogenèse des SMZL qui pourrait être contrôlée par l'activation de NOTCH2.

### **III. L'induction par la voie *NOTCH* de *MYC* est essentielle à la régulation de la survie cellulaire**

Nous avons donc identifié *MYC* comme étant potentiellement un gène cible de *NOTCH* induit dans les SMZL. Un crible par ARNs interférents a été effectué par une post-doctorante du laboratoire. Ce crible a permis de mettre en évidence que le gène *MYC* est essentiel à la survie et/ou à la croissance cellulaires (Figure 3, article). Afin d'identifier le rôle biologique de *MYC* dans les SMZL, j'ai effectué deux types d'expériences afin de valider les fonctions biologiques de *MYC*. Pour cette première expérience, nous avons voulu voir l'effet de l'inhibition de *MYC* dans ces cellules. Un knockdown par shRNA dirigé contre *MYC* a été donc réalisé. J'ai démontré que l'inhibition de *MYC* dans ces cellules entraînent une diminution significative de la proportion de cellules infectées par les shRNAs ciblant *MYC* (Figure 4, article). L'effet de l'inhibition de *MYC* sur les cellules Ri-1 indique que l'expression de *MYC* semble être essentiel à la survie et à la croissance cellulaires. Ces résultats sont retrouvés dans les différents types de lymphomes et leucémies où l'expression de *MYC* est induite. Ces résultats suggèrent que *MYC* pourrait jouer un rôle essentiel en aval de l'activation de la voie de signalisation NOTCH dans les processus d'initiation et/ou de progression tumorales des cellules dans les SMZL.

Ces données nous confortent dans l'idée que *MYC* est d'une part, potentiellement un gène cible direct de *NOTCH2* et d'autre part, que *MYC* ait un rôle crucial au niveau de la survie et de la croissance des cellules cancéreuses.

#### **IV. L'expression de *MYC* est critique et suffisante pour restaurer la survie cellulaire lorsque l'activité de *NOTCH2* est inhibée.**

La deuxième expérience pour valider le rôle biologique de *MYC* dans ces cellules est la complémentation fonctionnelle. J'ai voulu étudier l'effet d'une induction de l'expression de *MYC* dans ces cellules dans la condition où l'activité de *NOTCH2* est inhibée. Pour ce faire, il a fallu établir une stratégie pour forcer l'expression de *MYC* dans ces cellules. Dans le laboratoire, un plasmide rétroviral MIGRI a déjà été cloné avec une cassette *MYC*. J'ai donc utilisé ce plasmide MIGRI-*MYC* pour infecter mes cellules. J'ai également fait une infection contrôle avec le plasmide MIGRI vide. Cependant, j'ai constaté à 48h, une toxicité au niveau des cellules qui sur-exprimaient *MYC*. A partir de ces données, nous avons donc conclu que la surexpression exogène de *MYC* entraînait à une mort cellulaire et donc compromettait l'expérience. Nous avons donc réfléchi à une stratégie pour induire l'expression endogène de *MYC*. Pour ce faire, j'ai réalisé un CRISPR activation (CRISPRa). La fusion du dCas9 avec un activateur transcriptionnel (VP64) peut être ciblé grâce à un ARN guide aux régions autour du site d'initiation de la transcription, ici de -300 à +50 pb, ce qui va donner lieu à une activation de l'expression endogène de *MYC* dans les cellules Ri-1. J'ai donc infecté les cellules avec un plasmide permettant l'expression de la fusion dCas9-VP64 et de l'ARN guide ciblant la région promotrice de *MYC* (Figure 5A, article). Ces cellules infectées avec les différents guides control et ciblant *MYC* sont par la suite traitées soit avec du DMSO ou soit avec du CompE (Figure 5). J'ai réalisé une qPCR sur l'expression de *MYC* à partir des cellules infectées avec des sgRNA ciblant le gène de la Renilla ou *MYC* traitées avec du DMSO ou avec du GSI (Figure 5B, article). Nous observons que le niveau basal d'expression de *MYC* est similaire dans les cellules infectées avec le sgRNA control (sgRenilla) ou les sgRNAs ciblant *MYC* traitées avec du DMSO. Nous observons

qu'il y a un maintien de l'expression de *MYC* dans les cellules infectées avec le sgRNA control ou avec les sgRNAs ciblant *MYC* traitées avec du GSI (Figure 5B, article). J'ai par la suite évalué les effets sur la survie cellulaire de ces cellules possédant le maintien de l'expression *MYC* lorsque l'activité de *NOTCH2* est inhibée (Figure 5C, article). J'ai démontré que l'expression de *MYC* restaure la survie cellulaire dans la condition où l'activité de *NOTCH2* est réprimée (Figure 5C, figures supplémentaires 3). Nous nous sommes assurés que l'activité de *NOTCH2* était bien réprimée en faisant une qPCR sur *HES1* (Figure 5D, article). Ces résultats suggèrent donc que *MYC* a un rôle essentiel dans la survie des cellules cancéreuses dans les SMZL.

## **V. L'identification des sites de fixation de *NOTCH2* dans les cellules Ri-1**

Par la suite, à partir de ces résultats obtenus, nous avons élaboré une stratégie pour permettre d'identifier les sites de fixation de *NOTCH2*. Pour ce faire, nous avons décidé de faire une immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage haut débit (ChIP-seq). Durant ma thèse, j'ai essayé d'optimiser et d'ajuster les paramètres de la ChIP. Dans un premier temps, nous avons testé les hybridomes d'anticorps ICN-2 produits par le laboratoire du Dr. Artavanis-Tsakonas. Après différents test (Résultats supplémentaires 1A-B), nous avons réalisé une ChIP et un CUT&RUN. Cependant, les résultats de la qPCR, nous montrent qu'avec le niveau de matériel que je récupère (quantités faibles), il est possible que lors de l'immunoprécipitation, il y ait eu un important bruit de fond (Résultats supplémentaires 1C-D). Cela pourrait être du :

- A un manque de spécificité de l'anticorps primaire
- A la protéine A
- A la présence de billes qui peuvent se coller à la chromatine

Ainsi pour ces différentes raisons, cela ne permet pas un enrichissement suffisant pour surpasser le bruit de fond.

Par la suite, j'ai voulu insérer un tag HA au niveau de l'allèle endogène de *NOTCH2* par recombinaison homologue à l'aide de la technologie du CRISPR-Cas9. J'ai rencontré un problème lors de la transfection de ce système dans les cellules Ri-1. J'ai fait dans un premier temps, une transfection par nucléofection pour laquelle je n'ai obtenu qu'un taux de transfection de seulement 1%. J'ai donc changé de stratégie pour transfecter les cellules. J'ai utilisé la machine NepaGene Nepa21 pour électroporer les cellules Ri-1. J'ai obtenu 3% de cellules transfectées avec un taux de viabilité à 40%. J'ai donc trié ces cellules en cellule unique. Les cellules une fois triées en cellule unique n'ont pas survécus. Nous supposons que ces cellules ont besoin de communiquer de façon paracrine des signaux essentiels à leur survie comme l'activation de la voie de signalisation NOTCH. Du fait de ces problèmes rencontrés, il a fallu réfléchir à une autre stratégie pour être en mesure de faire la ChIP. Dans le laboratoire, une post-doctorante a réalisé pour son projet une ChIP en utilisant anticorps anti-GFP (Benbarche S., et al., 2019). Ce type de ChIP s'est montré efficace. Ainsi, j'ai donc réalisé une fusion protéique de ICN-2 et d'un tag GFP par la méthode de clonage Golden Gate. Cette construction a été cloné dans un vecteur rétroviral MIGRI. J'ai testé le plasmide contenant cette construction dans les cellules 293T afin de voir si le tag GFP peut interférer l'activité d'induction de la transcription de *NOTCH2* (Résultats supplémentaires 1E-F). J'ai réalisé une expérience de dual-luciférase assay en utilisant les gènes rapporteurs Renilla et luciférase. La construction contenant une répétition de 10 fois la séquence consensus de RBPJ couplée à un gène rapporteur à la luciférase (Résultat supplémentaire 1E). Cette expérience m'a permis d'observer que le tag GFP n'interférait pas dans l'activité fonctionnelle de ICN-2 (Résultat supplémentaire 1E). Par la suite, pour vérifier l'expression de la protéine de fusion, j'ai réalisé un WB en utilisant un anticorps anti-GFP (Résultat supplémentaire 1F). Nous observons une bande de taille à 137 kDa pour l'échantillon Ri-1 infectées avec la fusion protéique (Figure 5B). Ainsi, cette construction contenant la fusion protéique peut être utilisée pour cette étude. Après infection de

cette construction dans les cellules Ri-1, nous remarquons que la surexpression de cette construction semble avoir un effet toxique ou délétère sur la croissance des cellules. Ce qui limite la technique du fait d'une faible quantité de cellules exprimant la fusion protéique. La ChIP a été faite avec les anticorps anti-GFP et également contre les marques d'histones : H3K4me3 et H3K27ac. Ces dernières permettent de savoir si NOTCH2 est associé à des promoteurs et/ou à des enhanceurs. Les banques ont été réalisées et les échantillons ont été séquencés. Les ChIP effectuées sur les marques d'histones nous permettent de savoir si NOTCH2 pourrait par exemple, se fixer sur l'enhancer de *MYC*. Cependant, il n'y a pas eu de signal au niveau de la ChIP avec l'anticorps anti-GFP. Cela peut s'expliquer par un faible nombre de cellules utilisé. Une étude a permis de montrer que réaliser une ChIP avec un faible nombre de cellules pouvait augmenter les reads qui sont soit « unmapped » c'est-à-dire des reads qui ne sont pas retrouvés sur le génome de référence ou soit dupliqués. Ces raisons donnent lieu à une réduction du nombre de reads uniques générés et affectent donc la sensibilité de la ChIP (Gilfillan GD., Hughes T., Sheng Y., et al., 2012).

Ainsi, afin d'obtenir un grand nombre de cellules qui nous permettrait d'obtenir un fort signal, je vais cloner la fusion protéique dans des plasmides inductibles par la doxycycline.

## **VI. Corrélation positive de l'expression de *NOTCH2* et de *MYC* chez les patients SMZL**

Une étude faite sur une cohorte de patients SMZL (Watkins JA et al., 2012) a permis d'obtenir des données de microarray faits sur ces patients. Bien que nous n'ayons pas les profils mutationnels des patients, nous avons pu effectuer une étude de corrélation entre l'expression de *NOTCH2* et de *MYC* (Figure 6A). Nous montrons à partir de ces données de microarray, qu'il y a une forte corrélation positive entre l'expression de *NOTCH2* et l'expression de *MYC* (Figure 6A). Ainsi, ces données réalisés sur des patients suggèrent que l'expression de *NOTCH2* (couplée à son activation) induit l'expression de *MYC* contrairement à *NOTCH1* dont l'expression n'est pas corrélée avec

celle de *MYC*. Ce qui suggère que l'expression de *MYC* chez les patients SMZL est spécifiquement corrélée à celle de *NOTCH2*.

## **VII. L'identification de *MYC* comme cible direct de *NOTCH* peut être un début de piste vers une thérapie ciblée**

La famille du gène *MYC* est composée de trois membres : *MYC*, *MYCN* et *MYCL* qui codent respectivement pour c-MYC, N-MYC et L-MYC (Adhikari S, et al., 2005, Pelengaris S et al., 2002 et Dang CV, 2012). Ici, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à *MYC*. Ces oncoprotéines appartiennent à la famille des « super facteurs de transcription » qui régulent la transcription d'au moins 15% de tout le génome. Les effecteurs en aval de c-MYC participent à de nombreux processus impliqués dans l'homéostasie cellulaire telles que la biogenèse des ribosomes, le cycle cellulaire, le métabolisme, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la survie cellulaire et la surveillance immunitaire (Figure 18a). Le dysfonctionnement de la régulation de *MYC* est retrouvé dans de nombreux cancers. Dans cette étude, j'ai démontré que *MYC* pouvait être potentiellement un gène cible direct de *NOTCH2*. J'ai également montré que *MYC* était impliqué dans la survie cellulaire dans un lignée modèle de SMZL. Ainsi, *MYC* pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour traiter les patients SMZL mutés pour *NOTCH2*. Cependant, à ce jour, *MYC* est considéré comme un gène ne pouvant être directement ciblé par une thérapie. En effet, *MYC* étant un facteur de transcription, cela complique l'élaboration d'une molécule spécifique à celui-ci dans la mesure où il n'y a pas de site actif spécifique pour de petites molécules. De plus, *MYC* étant localisé dans le noyau, cela rend l'accès difficile et également impossible pour les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (Chen H., Liu H., and Qing G., 2018). C'est la raison pour laquelle, de nombreux laboratoires ont décidé de cibler *MYC* de manière indirecte. Certaines drogues vont le cibler à différents niveaux, soit au niveau transcriptionnel, soit au niveau traductionnel ou soit au niveau de l'activation (Figure 18b). Parmi l'utilisation de drogues ciblant la transcription de celui-ci, nous comptons, l'inhibiteur de *BRD4*: JQ1 (Delmore JE et al., 2011 et Filippakopoulos P et

al., 2010). Cet inhibiteur va rentrer en compétition avec la liaison des lysines acétylées et donc déplacer BRD4 de l'enhancer par lequel *MYC* est régulé. J'ai donc testé cette drogue sur les cellules Ri-1. JQ1 semble ne pas avoir d'effet sur la survie cellulaire des Ri-1. Cela suggère que les cellules Ri-1 ne sont pas sensibles à cette drogue. De plus, nous remarquons qu'il y a une induction de l'expression de *MYC* après traitement JQ1 par qPCR. Ces résultats semblent aberrants par rapport à l'effet inhibiteur de JQ1 sur l'expression de *MYC* dans d'autres cellules cancéreuses. Ce résultat surprenant aurait été également observé lors du traitement de certaines lignées de LAL-T (Communication personnelle du Dr. Puissant). De façon surprenante, nous avons également montré que l'IC50 de l'inhibiteur JQ1 dans les cellules Ri-1 est élevé : 325  $\mu$ M. En comparant cet IC50 avec des lignées de LAL-T ou de LAM connus pour être sensibles et efficaces pour inhiber l'activité transcriptionnelle de *MYC*, nous pourrions penser qu'il existe un mécanisme de résistance dans cette lignée cellulaire (résultats non montrés). Des études ont montré que *NOTCH* pouvait induire des résistances face à certains inhibiteurs dans les cancers du sein et dans les LAL-T (BeLow M., et al., 2020, Simoes BM et al., 2015, Rizzo P., et al., 2008, Acar et al., 2016, Knoechel B., et al., 2014, Yashiro-Ohtani Y., et al., 2014). Ainsi, j'ai traité les cellules Ri-1 avec une combinaison de faibles concentrations de GSI qui n'engendrent pas d'apoptose et de JQ1. Après analyse par qPCR et analyse de l'apoptose, nous n'avons observé aucun effet additif. Ainsi, nous pourrions supposer que le mécanisme de résistance pourrait être dû à une redondance par soit une autre protéine à bromodomaine ou soit par une autre voie de signalisation qui induirait en parallèle l'expression de *MYC*. Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager de réaliser un crible par ARN interférents ciblant des ARNm codant pour les mêmes facteurs utilisés pour le crible précédent et sur des cellules traitées avec soit du DMSO ou soit avec du JQ1 pendant 7 jours. Cela nous donnerait une idée des facteurs pouvant induire l'expression de *MYC* dans la lignée Ri-1. Il existe également un autre inhibiteur indirect de *MYC* ciblant la transcription ; l'inhibiteur de la cycline kinase 7 et 9 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et

dans la régulation de la transcription via leur interaction avec les facteurs généraux de la transcription tels que TFIID. Des études ont montré que cet inhibiteur montre un effet antitumoral dans les cellules de leucémies T aiguës (Chipumuro E et al., 2014, Chapuy B et al., 2013 et Kwiatkowski N et al., 2014). Cela pourrait être intéressant de traiter les cellules Ri-1 avec cet inhibiteur et d'observer un effet sur l'expression de *MYC*. S'il y a des effets significatifs sur la survie cellulaire, il peut être intéressant de faire une combinaison de traitements avec cet inhibiteur et du GSI à de faibles concentrations. Les autres traitements agissant sur la traduction ou sur l'activation de *MYC* n'ont pas été testés sur les cellules Ri-1. Cela pourrait être pertinent, si jamais le ciblage au niveau transcriptionnel de celui-ci était inefficace.

### **VIII. L'identification des gènes cibles potentiellement directs de NOTCH2 induits par l'activation de la voie NOTCH dans les SMZL**

A partir des résultats obtenus du RNA-seq, j'ai choisi six gènes selon les critères suivants :

- Les gènes sont significativement réprimés en présence de GSI et significativement réexprimés dans la condition « wash-off »
- Les gènes ont un rôle dans le développement, la maturation et la progression de cellules tumorales B

Nous avons identifié le gène *BCL6* comme pouvant être une cible potentiellement directe. Le gène *BCL6* peut être intéressant à étudier car *BCL6* connu pour avoir un rôle d'oncogène dans les lymphomes B et de répression du gène *NOTCH2* dans la maturation de cellules B folliculaires (Valls E. et Lobry C et al., 2017). Afin de valider la fonction biologique, j'ai donc réalisé un knockdown de *BCL6* à l'aide de shRNAs. Cependant, le knockdown de *BCL6* ne semble pas avoir d'effet sur la survie cellulaire par rapport au traitement par un inhibiteur de BCL6. Le traitement par FX1 provoque une augmentation du taux d'apoptose dans ces cellules (Résultats supplémentaires 5A). L'inhibiteur de *BCL6* ne présente aucun effet sur les expressions de *HES1* et *MYC*.

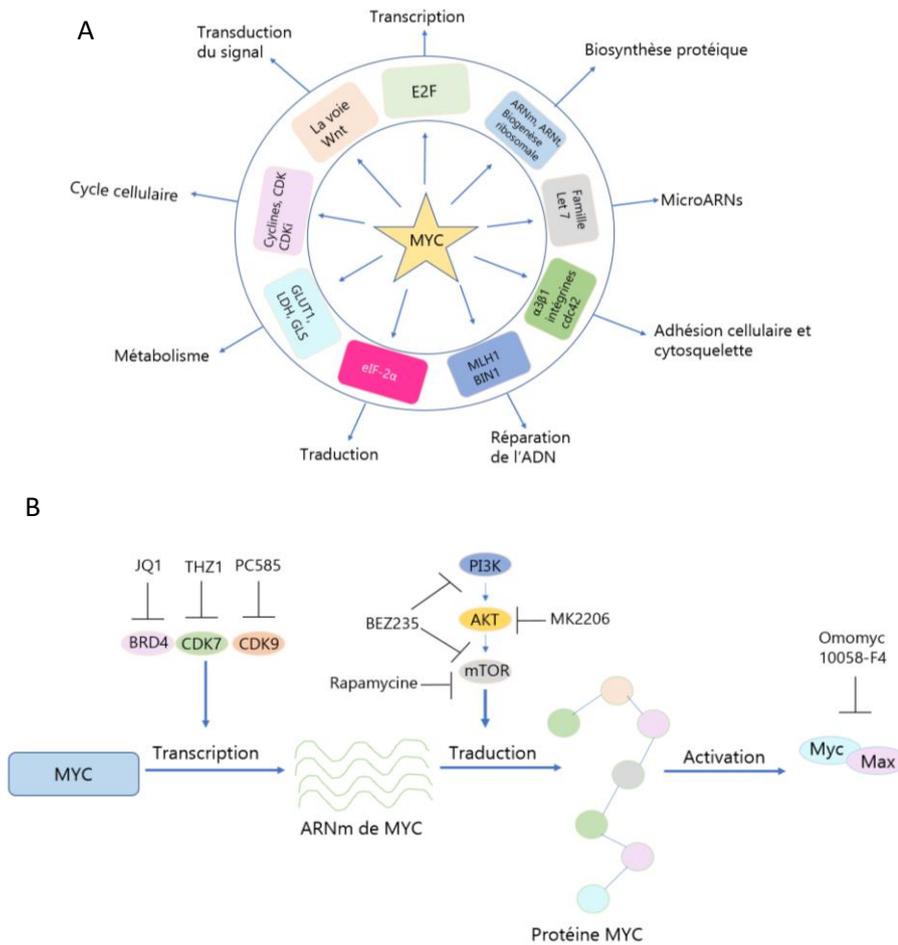
Ainsi, FX1 n'agit pas sur l'activité de *NOTCH2*. Afin de vérifier l'efficacité de cet inhibiteur sur l'activité de *BCL6*, nous pourrions faire une qPCR sur les gènes cibles de *BCL6* qui sont exprimés dans cette lignée cellulaire. Le gène *BCL6* étant un répresseur transcriptionnel, si l'inhibiteur a un effet sur l'activité de *BCL6*, nous observerons une activation de ses gènes cibles. Cela nous permettrait également de voir si l'effet sur la survie observée après traitement de FX1 est soit dû à une inhibition de *BCL6* ou soit dû à une toxicité aspécifique. Le knockdown induit une diminution de seulement 50% de l'expression de *BCL6*, nous pouvons supposer que cela peut être insuffisant pour observer une incidence sur la survie ou la prolifération cellulaire. Ainsi, afin de valider ces résultats et donc d'inhiber de façon génétique le gène *BCL6*, j'envisagerais un knockout par CRISPR/Cas9 de celui-ci ou un knockdown par CRISPRi. De plus, j'ai également effectué une induction endogène de *BCL6* par la technologie du CRISPRa. De plus, lorsque l'on fait une qPCR sur *BCL6*, nous constatons qu'il y a une diminution significative de *BCL6* dans la condition où les cellules ayant l'induction de *BCL6* sont traitées avec du CompE (Résultats complémentaires 6B). Il est difficile de conclure sur cette expérience car la complémentation fonctionnelle, donc ici la restauration de l'expression de *BCL6* par le CRISPRa ne semble pas être efficace. En effet, l'expression de *BCL6* est toujours inhibée lorsque l'on traite les cellules avec du GSI.

En conclusion de cette partie, nous avons trouvé pertinent d'identifier le potentiel rôle biologique de *BCL6* dans cette lignée cellulaire. Ce gène n'est exprimé que dans la maturation des cellules B folliculaires et est connu pour jouer le rôle d'oncogène dans les lymphomes B folliculaires. Le gène *BCL6* est également connu pour réprimer l'expression de *NOTCH2*. Ainsi, nous aurions pu penser qu'il aurait pu avoir un rôle de rétrocontrôle négatif de l'activité de *NOTCH2* dans les cellules SMZL. Par exemple, nous pouvons inhiber le gène *BCL6* en faisant un knockout et observer l'expression de *NOTCH2* ainsi que de *HES1*, afin d'observer un effet sur l'activité de la voie de signalisation *NOTCH2*. Nous aurions aussi pu voir si après traitement avec du FX1, il y avait une augmentation de l'expression de *NOTCH2*.

Les cinq autres gènes que j'ai sélectionnés et qui peuvent être pertinents à étudier et à valider leurs fonctions biologiques sont :

- Le gène *IRF4* (Interferon Regulatory Factor 4) connu pour réguler la différenciation des cellules pré-B. Une translocation d'*IRF4* est retrouvée dans plusieurs sous-types de lymphomes B tels que le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) (Salaverria I., Philipp C., et al., 2011).
- Le gène *GRB7* (Growth Factor Receptor Bound Protein 7) connu pour réguler la migration de cellules tumorales dans les leucémies lymphocytiques chroniques (Haran M., Chebatco S., et al., 2004).
- Le gène *IL10R $\alpha$*  (Interleukin Receptor  $\alpha$  10) connu pour être un facteur clé dans les réponses inflammatoires via la voie *JAK/STAT*. Sa surexpression provoque une survie et une expansion de cellules tumorales dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (Gupta M., Han JJ., Stenson M., Maurer M., et al., 2012).
- Le gène *CCR7* (récepteur à la cytokine 7) connu pour contrôler la migration de cellules T vers un tissu inflammé. Il a également été identifié comme un gène direct de *NOTCH1* dans les leucémies T. (Buonamici S., Trimarchi T., et al., 2009).
- Le gène *BCL2* connu pour réguler l'apoptose intrinsèque. *BCL2* est un oncogène connu dans les lymphomes B comme le lymphome diffus à grandes cellules B (Alizadeh AA., et al., 2000).

Nous validerons leurs fonctions biologiques, nous effectuerons une expérience de perte de fonction de ces gènes ainsi qu'une expérience de gain-de-fonction. Nous analyserons leurs rôles dans la prolifération, la croissance et la survie des cellules tumorales.



**Figure 18 : MYC régule de nombreuses fonctions cellulaires et est une cible thérapeutique difficile à traiter directement.**

(A) L'oncogène MYC régule de nombreux processus liés à l'homéostasie cellulaire. Myc régule un grand nombre de protéines codantes et de gènes non codants qui sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires incluant le cycle cellulaire, la biogenèse des protéines, l'adhésion cellulaire, le métabolisme, la transduction du signal, la transcription et la traduction. MYC est donc considéré comme un « super-facteur de transcription ». (B) Différentes stratégies visent à cibler MYC. Dans ce cas précis, il s'agit de cibler de façon indirecte MYC, du fait, d'une difficulté à traiter de façon spécifique et directe MYC. Ici, les différents inhibiteurs ciblent différents niveaux. Les inhibiteurs de BRD4, CDK7 et CDK9 inhibent l'expression de MYC au niveau transcriptionnel. L'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR permet le blocage de la traduction de la protéine Myc. L'inhibiteur du complexe d'activation de Myc-Max permet d'inhiber l'activation de MYC.

## Perspectives

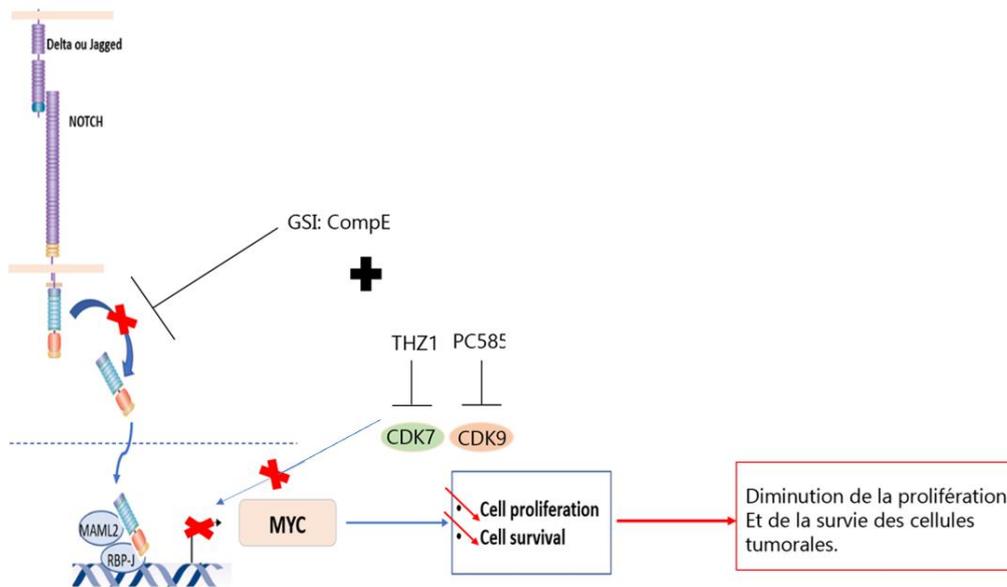
Pour les perspectives à moyen-terme, nous envisagerons d'utiliser les cellules primaires de patients mutés pour *NOTCH2*. Dans un premier temps, nous souhaiterions traiter ces cellules primaires avec du CompE et voir s'il y a une inhibition de l'activité de la voie de signalisation NOTCH2 et s'il y a un effet sur la survie cellulaire. Nous pourrions également traiter ces cellules avec les inhibiteurs de *MYC* que nous avons à disposition et effectuer les mêmes analyses que précédemment mentionnées. Nous pourrions également effectuer un RNA-seq de ces cellules primaires traités soit avec du DMSO ou soit avec du CompE. Cela permettrait de valider les données transcriptomiques obtenus à partir de la lignée Ri-1.

A ce jour, il n'existe aucun modèle murin de SMZL qui pourrait nous permettre de valider *in vivo* les résultats que nous avons obtenu sur la lignée Ri-1. Ainsi, nous envisageons de réaliser un modèle murin SMZL à l'aide de xénogreffe de patients afin de valider les résultats obtenus de manière *in vivo*. Cependant, ce type de lymphome B étant indolent, la xénogreffe risque de ne pas prendre. Ainsi, nous pourrions envisager d'utiliser des souris invalidées pour TP53 et induire un knock-in de l'ICN-2 dans ces souris. Les mutations TP53 et NOTCH2 étant deux mutations qui co-occurrent et qui sont spécifiquement retrouvées chez les patients SMZL.

Après validation du modèle murin SMZL, nous pourrions envisager avec les différentes drogues inhibitrices à disposition, traiter ces souris avec du GSI, des inhibiteurs indirects de *MYC* ou une combinaison des deux drogues. Après traitement, nous pourrions ainsi évaluer les effets sur la croissance et survie des cellules tumorales de manière *in vivo*.

## Conclusion générale

L'objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes moléculaires induits par l'activation de *NOTCH2* dans la pathogenèse des SMZL. Pour ce faire, j'ai donc cherché à identifier les effecteurs directs induits par *NOTCH2* dans les cellules SMZL. J'ai caractérisé une lignée cellulaire Ri-1 et défini comme le modèle *ex vivo* approprié pour cette étude. Par la suite, les analyses transcriptomiques que j'ai réalisées ont permis d'identifier l'oncogène *MYC* comme étant un gène potentiellement direct de *NOTCH2*. J'ai donc voulu chercher à valider les fonctions biologiques de *MYC* dans les cellules Ri-1. En validant les fonctions biologiques de *MYC*, j'ai démontré que l'expression de *MYC* est essentielle pour la régulation de la survie des cellules Ri-1. Cette étude permet donc une meilleure compréhension sur les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogenèse. De plus, en identifiant *MYC*, cela suggère que *MYC* est une cible thérapeutique potentielle pour traiter ce type de lymphome. En effet, une combinaison d'inhibiteur de l'activation de *NOTCH* et d'inhibiteur indirect de *MYC* pourrait être envisagée pour traiter ces patients. Ainsi, identifier les gènes cibles directs de *NOTCH2* permettrait d'orienter les différents types de thérapies disponibles vers ces cibles plutôt que sur *NOTCH2*. En effet, l'expression de *NOTCH* est requise dans la majorité des systèmes, plus particulièrement, le système gastro-intestinal. Des essais cliniques faits sur les patients LAL-T ont montré que les inhibiteurs de la gamma-sécrétase provoquent de fortes toxicités gastriques chez les patients. Ces résultats rendent ainsi l'utilisation des GSI impossible chez les patients SMZL. Par conséquent, l'identification de *MYC* comme un des effecteurs directs de *NOTCH2*, pourrait donc aboutir à des traitements ciblés sur l'effecteur *MYC* avec ou sans combinaison avec de GSI (Figure 19). Ces traitements pourraient ainsi, diminuer les effets secondaires indésirables de l'inhibiteur de l'activité de *NOTCH* et donc permettre un traitement plus spécifique pour les patients SMZL.



**Figure 19 : Identification de l'effecteur MYC comme étant un potentiel effecteur direct de NOTCH2 pourrait être envisagé comme une meilleure cible thérapeutique.**

La liaison du ligand au récepteur *NOTCH2* provoque un double clivage dont le deuxième opéré par la complexe gamma-sécrétase qui va permettre le relargage et la translocation de la partie intracellulaire de *NOTCH2* dans le noyau. Cela va induire la transcription de ces gènes cibles dont *MYC*. Ainsi, en combinant un inhibiteur de la gamma-sécrétase avec un inhibiteur de *MYC*, cela permettrait de diminuer significativement la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.

## Bibliographie

---

Aamot HV, Micci F, Holte H, et al 2005. G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma. *Br J Haematol*, 130: 890 – 901.

Abramson, J. S. & Shipp, M. A. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood* 106, 1164–1174 (2005).

Abdelrasoul, H., Werner M., Setz CS., Okkenhaug K. and Jumaa H., 2010. PI3K induces B-cell development and regulates B cell identity. *Sci. Rep* 8, 1327.

Acar A., Simoes BM., Clarke R., et al., 2016. A role for Notch signaling in breast cancer and endocrine resistance. *Stem Cells. Int.* 2016:1-6.

Adatia, A.K, 1966. Burkitt's tumor in the jaws. *Br. Dental Journal*, 120, pp. 315-326.

Adatia, A.K, 1978. Significance of jaw lesions in Burkitt's lymphoma. *Br. Dental Journal*, 145, pp. 263-266.

Adhikary S., Eilers M., 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:635-645.

Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N et al., 2005. Identification of Flt3+ lymphomyeloid stem cells lacking erythro-megakaryotic potential a revised roadmap for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121(2): 295-306.

Al-Shami, A., Spolski R., Kelly J., Fry, T., et al., 2004. A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4+ T cell development. *J. Exp. Med.* 200, 159-168.

Alkhatib, A., Werner M., Hug, E., Herzog S., et al., 2012. Foxo1 induced Ikaros splicing to promote immunoglobulin gene recombination. *J. Exp. Med.*, 209, 395-406.

Alvarez-Errico D., Lessmann E., and Rivera J., 2009. Adapters in the organization of mast cell signaling. *Immunol. Rev.* 232(1): 195-217.

Akito D., 2016. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J. of clinical experimental hematopathology.* 56(2): 71-78.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A *et al.* 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 403: 503–511.

Allman D., Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA et Hardy RR, 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple section points during peripheral B cell maturation. *J. Immunology.*, 167(12):6834-40.

Alt FW., Yancopoulos GD, Blackwell TK et al., 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209-1219.

Ansell SM., 2014. Brentuximab vedotin. *Blood.* 124 (22): pp. 3197-3200.

Anacak Y., Miller RC., Constantinou N., Mamusa AM., Epelbaum R. et al., 2004. Most cases of primary salivary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma are associated either with Sjogren syndrome or hepatitis C virus infection. *BR. J. Haematology.* 126(1) pp. 43-49.

Anderson, M. A., Huang, D. & Roberts, A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin. Hematol.* 51, 219–227 (2014).

Andjelkovic N, Zolnierowicz S., van Hoof C., Goris J. et Hemmings BA., 1996. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation terminator factor eRF1. *EMBO J.* 15 (24) pp. 7156-7167.

Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, et al; Integragruppo Italiano Linfomi, 2006 Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood*. 107(12):4643-4649.

Arcaini L, Burcheri S., Rossi A., Paulli M., et al., 2007. Prevalence of HCV infection in nongastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Ann Oncolog*. 18 (2), pp. 346-350.

Arcaini L., Rossi D., and Paulli M., 2016. Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. *Blood*. 127 (17): 2072-81.

Arends, T., Dege C., Bortnick A., Danhorn T., et al., 2019. CHD4 is essential for transcriptional repression and lineage progression in B lymphopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116, 10927-10936.

Armstrong SA., Mabon ME., Silverman LB., Stam RW., et al., 2004. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 103 (9): 3544-3546.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284: 770–6.

Aste-Amézaga M., Zhang N., Lineberger JE., Arnold BA., et al., 2010. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptor. *PLoS One*. 5 (2): e9094.

Babon JJ. Lucet IS., Murphy JM., Nicola NA, et Varghese LN., 2014. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem. J*. 462 (1) 1-13.

Baens M , Finalet Ferreiro J , Tousseyn T , et al . t(x;14)(p11.4;q32.33) is recurrent in marginal zone lymphoma and up-regulates GPR34 .*Haematologica* 2012; 97: 184– 188.

Bailis W., Yashiro-Ohtani Y., and Pear WS., 2014. Identifying direct Notch transcriptional targets using the GSI-washout assay. *Methods Mol. Biol.* 1187: 247-54.

Balis FM., Lester CM., Chrousos GP., Heideman RL., et Poplack DG., 1987. Differences in cerebrospinal fluid penetration of corticosteroids: possible relationship to the prevention of meningeal leukemia. *J. Oncol.* 5, 202-201.

Baldini L, Brugiattelli M, Luminari S, et al., 2003. Treatment of indolent B-cell nonfollicular lymphomas: final results of the LL01 randomized trial of the Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi . *J Clin Oncol.* 21: 1459 – 1465.

Barral P., Ecki-Doma J., Harwood NE et al., 2008. B cell receptor mediated uptake of CD1b-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 8345-8350.

Barbovic S. et Eaves CJ., 2014. Hierarchical organisation of fetal and adult hematopoietic stem cells. *Exp. Cell Res.* 329, 185-191.

Barker J et al., 1997, Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of steel hematopoietic stem cell defect. *Exp. Hematology.* 25 (6): 542-547.

Barretina J., Caponigro G., et al., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 483, 603-607.

Barrett NA., Malouf C., Kapeni C., Bacon WE., et al., 2016. Mll-AF4 confers enhanced self-renewal and lymphoid potential during a restricted window in development. *Cell Rep.* 16, 1039-1054.

Baylin SB., and Jones PA., 2011. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer.* 11, 726-734.

Bea S., Valdes-Mas R., Navarro A., et al., 2013. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc. Nat. Aca. of SCI. US.* 110: 18250-18255.

Begley CG., Aplan PD., Davey MP, Nakahara K., et al., 1989. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *PNAS*. 86 (6) 2031-2035.

Beitz LO., Fruman DA., Kurosaki T., Cantley LC., and Scharenberg AM., 1999. SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling. *JBC*. 274, 32662-32666.

BeLow M., and Osipo C., 2020. Notch signaling in breast cancer: a role in drug resistance. *Cells*. 9(10):2204.

Belver L et Ferrando A 2016. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 16 (8): 494-507.

Benbarche S., Lopez CK., Salataj E., et al., 2019. <https://doi.org/10.1101/680165>

Bercovich D., Ganmore I., Scott LM., Wainreb G., et al., 2008. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet*. 372(9648): 1484-92.

Berger F, Feldman P, Thieblemont C, et al., 2000. Non-malt marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*. 95: 1950 – 1956.

Bernt KM., and Hunger SP., 2014. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol*. 4, 54.

Bernard OA, Busson-LeConiat M., Ballerini P., Maychauffe., M et al., 2001. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35; q32), is associated with expression of the HOX11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 15(10): 1495-1504.

Bernardin F., Yang Y., Cleaves, R., Zahurak M., Cheng L., et al., 2002. TEL-AML1 expressed from t(12 ;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res.* 62, 3904-3908.

Bertoni F and Zucca E., 2006. Delving deeper into MALT lymphoma biology. *J Clin Invest.* 116(1):22-6.

Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis M., Simon JL., Guenet A., Gossier A., 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development.* 121: 2407-2418.

Bodor, C. et al., 2013. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 122, 3165–3168.

Bolam S, Orchard J, Oscier D., 1997. Fludarabine is effective in the treatment of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol.* 99(1):158-161.

Bonnerot, C - Hivroz, C, 1999. Signalisation et transport intracellulaire des immunorécepteurs. *Med. Sci. (Paris).* Vol. 15, N° 8-9; p.923-30

Bouffet E., Frappaz D., Pinkerton R., Favrot M., Philip T., 1991. Burkitt's Lymphoma: a model for clinical oncology. *Eur. J. of Cancer.* 27, pp. 504-509.

Braggio E, Dogan A, Keats JJ, et al., 2012. Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Mod Pathol.* 25: 651– 660.

Brauninger A, Spieker T., Mottok A., Baur AS., Kuppers R., and Hansmann ML,. 2001. Epstein-Barr virus (EBV)-positive lymphoproliferations in post-transplant patients show immunoglobulin V gene mutation patterns suggesting interference of EBV with normal B cell differentiation process. *Eur. J. of Immunology.* 33: 1593-1602.

Bray SJ. 2016. Notch signaling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 17, pp. 722-735.

Bray NL., Pimentel H., Melsted P and Pachter L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34(5): 525-7.

Brian, R Smith, 1990. Regulation of hematopoiesis. *Yale J. Bio. Med.* 63(5): 371-380.

Briski R, Feldman AL, Bailey NG, Lim MS, Ristow K, Habermann TM, et al. The role of front-line anthracycline-containing chemotherapy regimens in peripheral T-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 2014;4:e214.

Brodie EJ., Infantino S., Low MSY., and Tarlinton DM., 2018. Lyn, Lupus and B lymphocytes, a lesson on the critical balance of kinase signaling in immunity. *Front. Immunol.* 9: 401.

Brognard, J., Sierrecki E., Gao T., and Newton AC, 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol. Cell.* 25, 917-931.

Broome JD., 1963. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. *J. Exp. Med.* 118, 121-148.

Brouwer C., Vogels-Mentink TM., Keizer-Garritsen JJ et al., 2005. Role of 5'-nucleotidase in thiopurine metabolism: enzyme kinetic profile and association with thio-GMP levels in patients with acute lymphoblastic leukemia during 6-mercaptopurine treatment. *Clin. Chim. Acta.* 361(1-2): 95-103.

Brown MS., Ye J., Rawson RB., et al., 2000. Regulated Intramembrane Proteolysis: a control mechanism conserved from Bacteria to Human. *Cell.* Vol. 100, Issue 4, P391-398.

Brummer T., Shaw PE., Reth M., and Misawa Y., 2002. Inducible gene deletion reveals different roles for B-raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signaling. *EMBO J.* 21, 5611-5622.

Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, et al., 1996. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol.* 995-1000.

Buenrostro, J.D. et al. (2018) Integrated single-cell analysis maps the continuous regulatory landscape of human hemato-poietic differentiation. *Cell* 173, 1535–1548

Lu, R. et al. (2011) Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nat. Biotechnol.* 29, 928–933

Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, et al., 2009. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature.* 459(7249):1000–4.10.1038/nature08020.

Burg G., Kempf, W., Cozzio, A., Feit J, Willemze R., et al., 2005. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas: histological and molecular aspects. *J. Cutan. Pathol.* 32, 647-674.

Burkitt DP, Wright DH. 1970. Burkitt's lymphoma. 1970. Edinburgh: *E&S Livingstone.*

Burnett AK, Goldstone A., Hills RK., Milligan D., Prentice A., et al., 2013. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J. Clin. Oncology.* 31(10): 1293-301.

Calamito M., Juntilla MM., Thomas M., Northrup DL., Rathmell J., et al., 2010. Akt1 et Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood.* 115, 4043-4050.

Callet-Bauchu E , Baseggio L , Felman P , et al., 2005. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-malt marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia.* 19: 1818– 1823.

Camacho FI, Garcia JF, Sanchez-Verde L, et al., 2001. Unique phenotypic profile of monocytoid B cells: differences in comparison with the phenotypic profile observed in

marginal zone B cells and so-called monocytoid B cell lymphoma. *Am J Pathol* 158: 1363–1369.

Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, et al., 2001. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol.* 25(10):1268-1276.

Capone M., Hockett RD., and Zlotnik A., 1998. Kinetics of T cell receptor beta, gamma and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44+CD25+ pro-T thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12522-12527.

Cardenas MG., Yu W., Beguelin W., Teater MR., Geng H., et al., 2016. Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 126(9): 3351-3362.

Cassell JA., 2017. Highlights from this issue. *Sex Transm Infect.* 93(7):453

Castelli R, Wu MA, Arquati M, et al., 2016. High prevalence of splenic marginal zone lymphoma among patients with acquired C1 inhibitor deficiency. *Br J Haematol.*;172(6):902-908.

Chacon JI, Mollejo M, Munoz E, et al., 2002. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood.* 100(5):1648-1654.

Chan, A., Iwashima M., Turck CW. And Weiss A., 1992. ZAP-70: A 70kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell Press.* 71 (4) 649-662.

Chan CH, Hadlock KG, Fountg SK, et al., 2001 VH1-69 gene is preferentially used by hepatitis C virus-associated B cell lymphomas and by normal B cells responding to the E2 viral antigen. *Blood*. 97: 1023 – 1026.

Chang H., Qi C., Trieu Y., et al., 2009. Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenstrom's macroglobulinemia: a multicenter study. *Clin. Lymphoma Myeloma*. 9, pp. 36-8.

Chou WC., Levy DE. And Lee, CK., 2006. STAT3 positively regulates an early step in B-cell development. *Blood*. 108, 3005-3011.

Chen H., Liu H., and Qing G., 2018. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 3:5.

Chen W., Li Q., Hudson WA., Kumar A., Kirchhof N., and Kersey JH., 2006. A murine Mll4-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood*. 108, 669-677.

Chen Y., Zheng Y., You X., Yu, M., Fu. G., et al., 2016. Kras is critical for B-cell lymphopoiesis. *J. Immunol*. 196, 1678-1685.

Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al; 2014. Alliance, Australasian Leukaemia and Lymphoma Group; Eastern Cooperative Oncology Group; European Mantle Cell Lymphoma Consortium; Italian Lymphoma Foundation; European Organisation for Research; Treatment of Cancer/Dutch Hemato-Oncology Group; Grupo Espanol de Medula O´ sea; German High-Grade Lymphoma Study Group; German Hodgkin's Study Group; Japanese Lymphorra Study Group; Lymphoma Study Association; NCIC Clinical Trials Group; Nordic Lymphoma Study Group; Southwest Oncology Group; United Kingdom National. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 32(27):3059-3068.

Cheung M., Sharma A., Madhunapantula SV and Robertson GP., 2008. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res.* 68, 3429-3439.

Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF., 2017. ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. *Am J Gastroenterol.* 112(2):212-239.

Chapuy B, et al., 2013. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 24:777-790.

Chiang MY, et al., 2008. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest* 118:3181–3194.

Chipumuro E et al., 2014. CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. *Cell.* 159:1126-1139.

Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, et al. 2015. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet.* 47(9):1011–9.

Choukrallah MA., and Matthias P., 2014. The interplay between chromatin and transcription factor networks during B cell development: who pulls the trigger first? *Front. Immunol.* 5, 156.

Clappier E., Cuccuini W., Kalota A., Crinquette A., Cayuela JM., et al., 2007. The c-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood.* 110 :1251-1261.

Clipson A, Wang M, de Leval L, et al., 2015. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia.* 29(5):1177-1185.

Cobaleda C., Jochum W. and Busslinger M., 2007. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*. 449 (7161): 473-7.

Conacci-Sorrell M., McFerrin L., and Eisenman RN., 2014. An Overview of Myc and its interactome. *CSH Perspect. Med.* (1): a014357.

Conconi A, Franceschetti S, Aprile von Hohenstaufen K, et al., 2015. Histologic transformation in marginal zone lymphomas. *Ann Oncol*. 26(11):2329-2335.

Cook JR., Isaacson PG., Chott A., Nakamura S., Muller-Hermelink, HK. et al., 2008. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). SH Swerdlow, Campos E., Harris NL., World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4<sup>th</sup> ed.), *IARC Press, Lyon*.

Cooper, SL., and Brown PA., 2015. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. North. Am.* 65, 61-73.

Couronné L, Bastard C, Bernard OA., 2012. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 366: 95–96.

Cousar JB, McGinn DL, Glick AD, List AF, Collins RD. Report of an unusual lymphoma arising from parafollicular Blymphocytes (PBLs) or so-called 'monocytoid' lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 1987

Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, Tabbo' F, Gaudio M, Chiesa N, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516–32.

Cresson C., Péron S., Jamrog L., Rouquié N., Prade N., Dubois M., et al., 2018. PAX5A and PAX5B isoforms are both efficient to drive B cell differentiation. *Oncotarget*. 9, 32841-32854.

Croce CM. 2008. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 502-511.

Cutter AR., and Hayes JJ., 2015. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 589, 2914-2922.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49-63 (2014).

Damsky WE, Choi J. Genetics of cutaneous T cell lymphoma: from bench to bedside. *Curr Treat Options in Oncol.* 2016;17(7):33.

Dang CV., 2012. MYC on the path to cancer. *Cell.* 149:22-35.

Daniel NN and Rothman P., 2000. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene.* 19 (21): 2523-31.

Dawson MA., Prinjha RK., et al., 2011. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukemia. *Nature.* 478(7370) :529-33.

Decker T., Pasca di Magliano M., McManus S et al., 2009. Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity.* 30(4): 508-20.

De Kouchkovsky and Abdul-Hay M., 2016. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* 6(7):e441.

DeKoter RP and Walsh JC and et Singh H.,1998. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17(15): 4456-68.

DeKoter and Singh, 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 26;288(5470):1439-41.

Delmore, J. E. et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904–917 (2011).

Dengler HS., Baracho GV., Omori SA., and Bruckner S., et al., 2008. Distinct roles for FOXO1 at multiple stages of B cell differentiation. *Nat. Immunol.* 9(12): 1388-1398.

Dent AL., Shaffer AL., Yu X., et al., 1997. Control of inflammation, cytokine expression and germinal center formation by BCL-6. *Science*. 276(5312):589-92.

Deutsch AJ., Fruhwirth M., Aigelsreiter A., Cerroni L. and Neumeister P., 2009. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma are targeted by aberrant somatic hypermutation. *J. Invest Dermatol.* 129, pp. 476-479.

Dias S., Silva H., Cumano A. and Vieira P., 2005. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 201, 971-979.

Dias S., Mansson R., Gurbuxani R., Sigvardsson M and Kee BL., 2008. E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity*. 29, 217-227.

Diss TC, Wotherspoon AC, Peng HZ, et al: Immunoglobulin gene rearrangement in low-grade B-cell MALT lymphomas of salivary gland, myoepithelial sialadenitis and Sjogren's syndrome. *J Pathol* 1993;169:123A (suppl).

Dominguez-Sola, D. et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature Immunol.* 13, 1083–1091 (2012).

Dougherty MK., Muller J., Zhou M., Zhou XZ., Copeland TD., et al., 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol. Cell.* 17(2): 215-24.

Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, et al., 2013. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 24(4):857-877.

Dulmage BO, Akilov O, Vu JR, Falo LD, Geskin LJ. Dysregulation of the TOX-RUNX3 pathway in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015.

Dunwoodie SL, Henrique D, Harrison SM, and Beddington RS, 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development.* 124(16): 3065-76.

Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Bottorff DA, Hooton J, Blumberg PM, et al., 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood.* 95:3199-203

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 66(4):649-61.

Ema, Morita et Suda, 2014. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cell. *Exp. Hematol.* 42, 74-82.e2.

Erikson EH, Erikson JM, Kivnick HQ., 1986. Vital involvement in old age. New York: W. W. Norton & Co.

Ersahin T., Tuncbag N. and Cetin-Atalay R., 2015. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* 11(7): 1946-54.

Escalante CR., Shen L., Escalante MC., Brass AL., Edwards TA., Singh H. and Aggarwal AK., 2002. Crystallization and characterization of PU.1/IRF-4/DNA ternary complex. *J. Struct. Biol.* 139(1): 55-9.

Essig S., Li Q., Chen Y., Hitzler J., Leisenring W., Greenberg M., et al., 2014. Estimating the risk for late effects of therapy in children newly diagnosed with standard risk acute lymphoblastic leukemia using an historical cohort: a report from Childhood Cancer Survivor Study. *Lancet*. 15(8): 841-851.

Estey EH., 2014. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *AM. J. Hematol*. 89(11): 1063-81.

Falini B, Tiacci E, Pucciarini A, et al., 2003. Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Blood*. 102: 3684–3692.

Famili, Wiekmeijer, and Staal., 2017. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Sci. OA*. 3, FSO186.

Ferrando AA., Neuberg DS., et al., 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. (1): 75-87.

Frank MJ., Bensinger DW., Hong JS., Knosp WM., Xu L., et al., 2009. Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood*. 113, 2478-2487.

von Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian LA., McNeil T., et al., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 nonredundant cytokine. *J. Exp. Med*. 181, 1519-1526.

Fenaux P., Mufti GJ., Hellstrom-Linberg E., Santini V., Gattermann N., Germing U., et al., 2010. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol*. 28(4): 562-9.

Feng J., Wang H., Shin DM., Masiuk M., Qi CF. and Morse HC 3<sup>rd</sup>., 2011. IFN regulatory factor 8 restricts the size of the marginal zone and follicular B cell pools. *J. Immunol*. 186(3): 1458-66.

Ferrario A, Merli F, Luminari S, et al., 2011. Phase II fludarabine and cyclophosphamide for the treatment of indolent B cell nonfollicular lymphomas: final results of the LL02 trial of the Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL). *Ann Hematol.* 90: 323 – 330.

Ferreira BI, García JF, Suela J, et al., 2008. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica.* 93: 670 – 679.

Filippakopoulos, P. et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067–1073 (2010).

Fischer M., Schwieger M., Horn S., Niebuhr B., Ford A., et al., 2005. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene.* 24, 7579–7591.

Foon KA, Lichtman MA. *Williams,* 2010. General Considerations of Lymphoma: Epidemiology, Etiology, Heterogeneity, and Primary Extranodal Disease. *Hematol.* 8ed. pp. 1–39. (97).

Fuxa and Busslinger, 2007. Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of *Pax5* in support of its B cell identity function. *J. Immunol.* 178(12): 8221.

Garcia-Peydro M., de Yébenes VG., and Toribio ML., 2006. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J. Immunol.* 177, 3711–3720.

Gaulard P, de Leval L. The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. 2014. Role of the microenvironment in PTCL, describing AITL as a paradigm for crosstalk between tumor cells and the microenvironment. *Seminars in cancer biology.* 24:49–60

Geahlen RL, 2009. Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793(7): 1115-27.

Gebhart J, Lechner K, Skrabs C, et al., 2014. Lupus anticoagulant and thrombosis in splenic marginalzone lymphoma. *Thromb Res.* 134(5): 980-984.

Georgopoulos, K., Bigby M., Wang JH., Molnar A., Wu P., et al., 1994. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineage. *Cell.* 79, 143-156.

Ghimire P, Wu GY, Zhu L et al., 2011. Primary gastrointestinal lymphoma. *World J Gastroenterol.* 17(6):697-707.

Gilfillan GD., Hughes T., Sheng Y., et al., 2012. Limitations and possibilities of low cell number ChIP-seq. *BMC Genomics.* 13:645.

Girardi M., Heald PW., and Wilson LD., 2017. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N. Engl. J. Med.* 350, 1978-1988.

Glasmacher E., Agrawal S., Chang AB., Murphy TL., Zeng W., et al., 2012. A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science.* 338(6109): 975-80.

Godfrey DI., Kennedy K., Suda T., and Zlotnik A., 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 150, 4244-4252.

Golay, J., Erba, E., Bernasconi, S., Peri, G. & Introna, M., 1994. The A-myb gene is preferentially expressed in tonsillar CD38+, CD39-, and sIgM- B lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cell lines. *J. Immunol.* 153, 543-553.

Goldberg JM., Silverman LB., Levy DE., Dalton VK., Gelber RD., et al., 2003. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J. Clin Oncol.* 21(19): 3616-22.

Gordon WR., Arnett KL., and Blacklow SC., 2008. The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* 121(Pt 19): 3109-19.

Grawunder U., Leu T., Schatz DG., Werner A., Rolink AG., et al., 1995. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in pre-B cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity.* 3, 601-608.

Grogg KL., Attygalle AD., Macon WR., Remstein ED., Kurtin PJ and Dogan A., 2005. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a neoplasm of germinal center T-helper cells? *Blood.* 106(4): 1501-1502.

Guan KL., Figueroa C., Brtva TR., Zhu T., et al., 2000. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J. Biol. Chem.* 275, 27354-27359.

Gupta M, Han JJ, Stenson M, Maurer M, Wellik L, Hu G *et al.* 2012. Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma : a mechanism of aberrant JAK2 activation. *Blood.* 119: 2844–2853.

Gupta S., Ramjaun AR., Haiko P., Wang Y., Warne PH., et al., 2007. Binding of ras phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell.* 129, 957-968.

Gurniak CB., and Berg LJ., 1996. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood.* 87, 3151-3160.

Gutierrez-Camino A., Martin-Guerrero I., Lopez-Lopez E., Echebarria-Barona A., et al., 2016. Lack of association of CEP72rs924607 TT genotype with vincristine-related peripheral neuropathy during the early phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment in Spanish population. *Pharmacogenet. Genomics.* 26, 100-102.

Hagenbeek TJ., and Splits H., 2008. T-cell lymphomas in T-cell-specific Pten-deficient mice originate in the thymus. *Leukemia*. 22(3): 608-19.

Haider A, Steininger A, Ullmann R, Hummel M, Dimitrova L, Beyer M, et al. Inactivation of RUNX3/p46 promotes cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2016;136(11):2287–96.

Hanahan D., and et Weinberg RA., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646-674.

Hann SR., 2014. MYC cofactors: Molecular switches controlling diverse biological outcomes. *CSH Perspect. Med.* (9): a014399.

Hardy RR., Carmack CE., Shinton SA., Kemp JD., and Hayakawa K., 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173, 1213-1225.

Hatada MH., Lu XD., Laird ER., Green J., Morgenstern JP., et al., 1995. Molecular-basis for interaction of the protein-tyrosine kinase Zap-70 with the T-cell receptor. *Nature*. 377, pp. 32-38.

Hatano M, Roberts CW, Minden M, Crist WM, Korsmeyer SJ.,1991. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science*. 253:79–82.

Haran M;., Chebatco S., Flaishon L., et al., 2004. Grb7 expression and cellular migration in chronic lymphocytic leukemia: a comparative study of early and advanced stage disease. *Leukemia*. 18, 1948-1950.

Heilgeist A, McClanahan F, Ho AD, et al., 2013. Prognostic value of the follicular lymphoma international prognostic index score in marginal zone lymphoma: an analysis of clinical presentation and outcome in 144 patients. *Cancer*. 119: 99– 106.

Heinz S., Benner C., Spann N., Bertolino E., Lin YC., et al., 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell.* 38, 576-589.

Heiss E., Masson K., Sundberg C., Pedersen M., Sun J., et al., 2006. Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Blood.* 108, 1542-1550.

Heltemes-Harris LM., Willettz MJL., Ramsey LB., Qiu YH., Neeley ES., et al., 2011. Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* 208, 1135-1149.

Henderson AJ., McDougall S., Leiden J., and Calame KL., 1994. GATA elements are necessary for the activity and tissue specificity of the T-cell receptor beta-chain transcriptional enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 14(6): 4286-94.

Hendriks R.W., Nawijn, M.C., Engel, J.D., van Doorninck, H., Grosveld, F., and Karis, A. 1999. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur. J. Immunol.* 29:1912–1918.

Herranz D., Ambesi-Impiombato A., Palomero T., Schnell SA., Belver L., et al., 2014. A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 20(10): 1130-7.

Heigwer F., Kerr G., and Boutros M., 2014. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods.* 11(2): 122-3.

Himes RH., Kersey RN., Heller-Bettinger I., and Samson FE., 1976. Action of vinca-alkaloids vincristine, vinblastine and désacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Cancer Res.* 36, 3798-3802.

Ho IC., Vorhees P., Marin N., Oakley BK., Tsai SF., Orkin SH., and Leiden JM., 1991. Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T-cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 10(5): 1187-92.

Hobbs GA., Der CJ., and Rossman KL., 2016. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell. Sci.* 129, 1287-1292.

Hochster HS, Oken MM, Winter JN, et al., 2000. Phase I study of fludarabine plus cyclophosphamide in patients with previously untreated low-grade lymphoma: results and long-term follow-up--a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 18: 987 – 994.

den Hoed MA., Plujim SM., te Winkel ML., de Groot-Kruseman HA., Fiocco M., et al., 2015. Aggravated bone density decline following symptomatic osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 100(12): 1564-1570.

Hoellenriegel, J. et al. The phosphoinositide 3'-kinase  $\delta$  inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118, 3603–3612 (2011).

Homminga I., Pieters R., Langerak AW., de Rooi JJ., Stubbs A., Verstegen M., et al., 2011. Integrated transcript and genome analyses reveals NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 19(4): 484-97.

Hozumi K., et al., 2004. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells *in vivo*. *Nature Immunol.* 5, 638-644.

Huang Y, Su MW, Jiang X, Zhou Y., 2015. Evidence of an oncogenic role of aberrant TOX activation in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 125(9):1435–43.

Hunger SP., 2011. Tyrosine kinase inhibitor use in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 361-365.

Hunger SP., Lu X., Camitta BM., Gaynon PS., Winick NJ., et al., 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* 30(14): 1663-9.

Hunger SP and Mullighan CG., 2015. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N. Engl. J. Med.* 373, 1541-1552.

Hunter ZR, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N., Vos JM., Liu X., et al., 2016. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 128:827–38

Iannitto E, Luminari S, Tripodo C, et al., 2015. Rituximab with cyclophosphamide, vincristine, non-pegylated liposomal doxorubicin and prednisone as first-line treatment for splenic marginal zone lymphoma: a Fondazione Italiana Linfomi phase II study. *Leuk Lymphoma.* 56(12):3281-3287

Iborra S., Soto M., Stark-Aroeira L., Castellano E., Alarcon B., et al., 2011. H-ras and N-ras are dispensable for T-cell development and activation but critical for protective Th1 immunity. *Blood.* 117(19): 5102-5111.

Iborra S., Ramos M., Arana DM., Lazaro S., Aguilar F., Santos E., et al., 2013. N-Ras couples antigen receptor signaling to Eomesodermin and to functional CD8+ T cell memory but not to effector differentiation. *J. Exp. Med.* 210(7): 1463-79.

Ichiyama K, Chen T, Wang X, Yan X, Kim BS, Tanaka S, et al., 2015. The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity.* 42(4):613–26.

Iritani BM., Forbush KA., Farrar MA., and Perlmutter RM., 1997. Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *EMBO J.* 16, 7019-7031.

Isaacson P., and Wright DH., 1983. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: a distinctive type of B cell lymphoma. *Cancer.* 52, pp. 1410-1416.

Isaacson P., 1997. Splenic marginal zone lymphoma. *Adv An Path.* 4: 191–201.

Ishida Y., Maeda M., Urayama KY., Kiyotani C., Aoki Y., Kato Y., et al., 2014. Secondary cancers among children with acute lymphoblastic leukemia treated by the Tokyo Children's Cancer Study Group protocols: a retrospective cohort study. *Br. J. Hematol.* 164, 101-112.

Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, et al., 2010. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 115(5):1026–36.

Iqbal J, Wright G, Wang C, Rosenwald A, Gascoyne RD, Weisenburger DD, et al., 2014. Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 123(19):2915–23.

Jacobsen JA., Woodard J., Mandal M., Marcus R., et al., 2017. EZH2 regulates the developmental timing of effectors of the pre-antigen receptor checkpoints. *J. Immunol.* 198(12): 4682-4691.

Jackson A., Mian M., Kalpadakis C., Pangalis P., Tahis A., et al., 2015. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue of the salivary glands: a multicenter, international experience of 248 patients (IELSG 41). *Oncol.* 20, pp. 1149-1153.

Johnson L., Greenbaum D., Cichowski K., Mercer K., Murphy E., et al., 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-Ras. *Genes Dev.* 11, 2468-2481.

Johrens K, Shimizu Y, Anagnostopoulos I, et al., 2005. T-bet-positive and IRTA1-positive monocytoid B cells differ from marginal zone B cells and epithelial-associated B cells in their antigen profile and topographical distribution. *Haematologica.* 90: 1070–1077.

Jones B., Freeman AI., Shuster JJ., Jacquillat C., Weil M., et al., 1991. Lower incidence of meningeal leukemia when prednisone is replaced by dexamethasone in the treatment of acute lymphocytic leukemia. *Med. Pediatr. Oncol.* 19, 269-275.

Joulin V., Bories D., Eleouet JF., Labastie MC., Chretien S., Mattei MG., Romeo PH., 1991. A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* 10, pp. 1809-1816.

Joutel A., Vahedi K., et al., 1997. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 350, 1511-1515.

Joutel A., Andreux F., Gaulis S., et al., 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J. Clin. Invest.* 150, 597-605.

Juárez-Salcedo LM, Sokol L, Chavez JC, Dalia S., 2018. Primary Gastric Lymphoma, Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Treatment. *Cancer Control.* 25(1):1073274818778256.

Jung M., Philpott M., Muller S., et al., 2014. Affinity map of BRD4 interactions with the histone H4 tail and small molecule inhibitor JQ1. *J. Bio. Chem.* 289:9304-9319.

Juntilla MM., Wofford JA., Birnbaum MJ., Rathmell JC., and Koretzky GA., 2007. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Scia. USA.* 104, 12105-12110.

Kalpadakis C, Pangalis GA, Angelopoulou MK, et al., 2013. Treatment of splenic marginal zone lymphoma with rituximab monotherapy: progress report and comparison with splenectomy. *Oncologist.* 18(2):190-197.

Kambayashi T., and Koretzky GA., (2007). Proximal signaling events in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 544–552.

Kanno T., et al., 2004. Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Molecular cell*. 13:33-43.

Karasuyama H., Kudo A., and Melchers F., 1990. The proteins encoded by the VpreB and lamda 5 pre-B-cell-specific genes can associated with each other and with mu heavy chain. *JEM*. 172(3): 969-972.

Karin. M., 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem*. 270(28): 16483-6.

Kato M and Manabe A., et al., 2018. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 60, 4-12.

Kawada H, Yoshimitsu M, Nakamura D, Arai A, Hayashida M, Kamada Y, et al., 2015. A retrospective analysis of treatment outcomes in adult T cell leukemia/lymphoma patients with aggressive disease treated with or without allogeneic stem cell transplantation: a single-center experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 21(4):696–700.

Kazi JU., and Ronnstrand L., 2019. The role of SRC family kinases in FLT3 signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 107, 32-37.

Kempf W., Zimmermann A-K and Mitteldorf C., 2019. Cutaneous lymphomas-An update 2019. *Hematol Oncol*. 37 Suppl 1, 43-47.

Kennedy M., Gonzalez-Sarmiento R., Kees U., Lampert F., Dear N., Boehm T., et al., 1991. HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 8900–8904

Khalil MO., Morton LM., Devesa SS., Chcek DP., Curtis RE., Weisenburger DD., et al., 2014. Incidence of marginal zone lymphoma in the United States, 2001-2009 with a focus on primary anatomic site. *Br. J. Haematol*. 165(1), pp. 67-77.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, and Morrison SJ, 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121(7): 1109-21.

Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin GH, Chiang MY, et al., 2012. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J. Exp. Med.* 209(9): 1553-65.

Kiel MJ, Sahasrabudhe AA, Rolland DC, et al., 2015. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sezary syndrome. *Nat Commun.* 6:8470.

Kikuchi K, Lai AY, Hsu C-L, and Kondo M., 2005. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* 201, 1197-1203.

Klein L, Kyewski B, Allen PM, and Hogguist KA., 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nat. Rev. Immunol.* 14(6) : 377-391.

Klinakis A, Szabolcs M, Politi K, et al., 2006. *Myc* is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. *PNAS*. 103(24): 926269267.

Knoechel B, et al., 2014. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 46(4): 364-370.

Knoechel B, Bhatt A, Pan L, Pedamallu CS, Severson E, Gutierrez A, et al., 2015. Complete hematologic response of early T-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia to the  $\gamma$ -secretase inhibitor BMS-906024: genetic and epigenetic findings in an outlier case. *CSH Mol. Case Stud.* 1(1): a000539.

Knight T and et Irving JAE., 2014. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. *Front Oncol.* 4, 160.

Knutson, S. K. et al., 2012. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nature Chem. Biol.* 8, 890–896.

Ko M., Bandukwala HS., An J., Lamperti ED., Thompson EC., et al., 2011. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 14566-14571.

Kojima M., Shimizu M., Nishikawa Y., Tamaki Y., Ito H., Tsukamoto N., et al., 2007. Primary salivary gland lymphoma among Japanese: a clinicopathological study of 30 cases. *Leuk. Lymphoma.* 48, pp. 1793-1798.

Kondo M., Weissman IL., and Akashi K., et al., 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 91, 661-672.

Koretzky, GA., Abtahian MA., Silverman A., et al., 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signaling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 67-78.

Kopan R., Ilagan MX., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137, pp. 216-233.

Krangel MS., et al., 2009. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 133-139.

Kridel, R., Sehn, L. H. and Gascoyne, R. D., 2012. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J. Clin. Invest.* 122, 3424–3431.

Kridek R., Meissner B., Rogic S., et al., 2012. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood.* 119(9):1963-71.

Kumararatne DS., and McLennan ICM et al., 1981. Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors. *Eur. J. Immunology.* 11(11): 865-869.

Kunz JB., Rausch T., Bandapalli OR., Eilers J., Pechanska P., Schuessele S., Assenov Y., et al., 2015. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica*. 100(11): 1442-50.

Kuo FC., and Sklar J., 1997. Augmented expression of a human gene for 8-oxoguanine DNA glycosylase (MutM) in B lymphocytes of dark zone in lymph node germinal centers. *J. Exp. Med.* 186, 1547-1556.

Kuo YC., Huang K-Y., Yang C-H., Yang Y-S., et al., 2008. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* 283, 1882-1892.

Kuo SH, Yeh KH, Chen LT, Lin CW, Hsu PN, Hsu C, Wu MS, Tzeng YS, Tsai HJ, Wang HP, Cheng AL., 2014. Helicobacter pylori-related diffuse large B-cell lymphoma of the stomach: a distinct entity with lower aggressiveness and higher chemosensitivity. *Blood Cancer J.* 20; (4):e220.

Kuppers R., and Dalla-Favera R., 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 20, 5580-5594.

Kuppers R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Rev. Cancer*. 5, 251-262.

Kwiatkowski N et al., 2014. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature*. 511:616-620.

Lardelli M., Dahlstrand J., Lendahl U., 1994. The novel *Notch* homologue mouse *Notch 3* lacks specific EGF-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech. Dev.* 46, pp. 123-136

Landry DB., Engel JD., and Sen R., 1993. Functional GATA-3 binding sites with murine CD8 alpha upstream regulatory sequences. *J. Exp. Med.* 178(3): 941-9.

Leadbetter EA., Brigl M., Illarionov P., Cohen N., Luteran MC., Pillai S., et al., 2008. NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc. Natl. Sci. USA.* 105(24): 8339-44.

Lecuit M, Abachin E, Martin A, Poyart C, Pochart P, Suarez F, Bengoufa D, Feuillard J, Lavergne A, Gordon JI, Berche P, Guillevin L, Lortholary O., 2014. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med.* 350(3):239-48.

Ledda F., and Paratcha G., 2007. Negative Regulation of receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a developing field. *Biomark Insights.* 2, 45-58.

Lee PP., Fitzpatrick DR., Beard C., Jessup HK., Lehar S., et al., 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity.* 15, 763-774.

Lefrère F, Hermine O, Belanger C, et al., 2000. Fludarabine: an effective treatment in patients with splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Leukemia.*14(4):573-575.

Lefrère F, Hermine O, François S, et al. 2000. Lack of efficacy of 2-chlorodeoxyadenoside in the treatment of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 40(1-2):113-117

Lehr S., Kotzka J., Avci H., Sickmann A., Meyer HE., et al., 2004. Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. *Biochemistry.* 43, 12133-12140.

Lelli KM., Slattery M., and Mann RS., 2012. Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu. Rev. Genet.* 46, 43-68.

Lemonnier F, Couronne L, Parrens M, Jais JP, Travert M, Lamant L, et al., 2012. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood.*120(7):1466–9.

Lenglet J, Traulle C, Mounier N, et al., 2014. Long-term follow-up analysis of 100 patients with splenic marginal zone lymphoma treated with splenectomy as first-line treatment. *Leuk Lymphoma.* 55(8):1854-1860.

de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G, et al., 2007. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.*109(11):4952–63. First description of T<sub>FH</sub> cells as the cell of origin in AITL using GEP.

de Leval., Gisselbrecht C., and Gaulard P., 2010. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 148(5): 673-89.

Li L., Krantz D., et al., 1997. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* (3):243-51.

Li L., Leid M., and Rothenberg EV., 2010a. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science.* 329, 89-93.

Li L-X., Goetz CA., Katerndahl CDS., Sakaguchi N., and Farrar MA., 2010b. A Flt3- and Ras-dependent pathway primes B cell development by inducing a state of IL-7 responsiveness. *J. Immunol.* 184, 1728-1736. 15, 554.

Li W., Xu H., Xiao T., et al., 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *BMC Method.*

Liang D-C., Chen S-H., Liu H-C., Yang C-P., Yeh T-C., et al., 2018. Mutational status NRAS, KRAS, and PTPN11 genes is associated with genetic/cytogenetic features in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 65.

Lin H., and Grosschedl R., 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*. 376, 263-267.

Lindsell CE., Shawber CJ., Boulter J., Weinmaster G., 1995. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*. 80(6): 909-17.

Lio C-W., Zhang J., Gonzalez-Avalos E., Hogan PG., Chang X., and Rao A., 2016. Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factor regulate DNA modification and chromatin accessibility. *Elife* 5.

Litzow MR and Ferrando AA., 2015. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 126(7): 833-41.

Liu Y-J., and Banchereau J., 1996. In Handbook of Experimental Immunology (eds Weir D., Blackwell C., Herzenberg L., and Herzenberg L.) *Blackwell Scientific, Oxford*. 93.1-93.9.

Liu D., Jenab J., and Rosenberg N., 1997. Kappa and lambda rearrangement occur simultaneously in transformed pre-B cells. *J. Immunol*. 159, 6061-6069.

Liu F., Yang X., Geng M., and Huang M., 2018. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin*. 8, 552-562.

Lone W., Alkhiniji A., Manikkam-Umakanthan J., and Iqbal J., 2018. Molecular insights into pathogenesis of peripheral T cell lymphoma: a review. *Curr. Hematol. Malign. Rep*. 13(4): 318-328.

Lu, R. et al., 2011. Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nat. Biotechnol*. 29, 928-933

Lu, R., Kay, L., Lancki, D.W. and Singh., 2003. H. IRF-4,8 orchestrate the pre-B to B transition in lymphocyte development. *Genes Dev.* 17, 1703–1708.

Luger K., Mader AW., Richmond RK., Sargent DF., and Richmond TJ., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389, 251-260.

Lyman SD., and Williams DE., 1995. Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. *Curr. Opin. Hematol.* 2, pp. 177-181.

Lyman SD., and Jacobsen SE., 1998. c-kit ligand and Flit3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood.* 91(4): 1101-34.

Ma S., Pathak S., Trinh L., and Lu R., 2008. Interferon regulatory factor 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B development. *Blood.* 111, 1396-1403.

Maddocks K., 2018. Update on mantle cell lymphoma. *Blood.* 132(16): 1647-1656.

Maehama T., and Dixon JE., 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 273(22) : 13375-8.

Malfertheiner P, Megraud F, Morain CAO, et al., 2016. Management of Helicobacter pylori infection — the Maastricht V / Florence Consensus Report. *Gut.* 0:1–25.

Malinge S, Ben-Abdelali R, Settegrana C, Radford-Weiss I, Debre M, Beldjord K, Macintyre EA, Villeval JL, Vainchenker W, Berger R. et al., 2007. Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*109(5):2202–2204.

Malouf C., and Ottersbach K., 2018. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 417-446.

Mandal M., Powers SE., Ochiai K., Georgopoulos K., Kee BL., Singh H., and Clark MR., 2009. Ras orchestrates exit from the cell cycle and light-chain recombination during early B cell development. *Nat. Immunol.* 10, 1110-1117.

Mandal M., Powers SE., Maienschein-Cline M., Bartom M., Hamel KM., et al., 2011. Epigenetic repression of the IgK locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat. Immunol.* 12, 1212-1220.

Mandal M., Maienschein-Cline M., Tanaka A., Teng G., Tuteja JH., et al., 2018. BRWD1 orchestrates epigenetic landscape of late B lymphopoiesis. *Nat Commun.* 9, 3888.

Mansoor A., Medeiros LJ., Weber DM., et al., 2001. Cytogenetic findings in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia. Chromosomal abnormalities are associated with the polymorphous subtype and an aggressive clinical course. *Am J Clin. Pathol.* 116, pp. 543-549.

Marasca R, Vaccari P, Luppi M, et al., 2001. Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C virus-positive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 159: 253–261.

Martensson IL., and Ceredig R., 2000. Role of the surrogate light chain and the pre-B cell receptor in mouse B-cell development. *Immunology.* 101, 435-441.

Martin F., and Kearney JF., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2(5) : 323-35.

Martinez N., Almaraz C., Vaqué JP., Varela I., Derdak S., Mollejo M., et al., 2014. Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia*. 28(6): 1334-40.

Martinez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, et al., 2005. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 19(12):2254–63.

Martinez-Delgado B., 2006. Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiles. *Hematol Oncol*. 24(3):113–9.

Mason DY., Bastard C., Rimokh R., Dastugue N., Huret JL., Kristoffersson U., et al., 1990. CD30-positive large cell lymphomas (“Ki-1 lymphoma”) are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br. J. Haematol*. 74(2): 161-8.

Matutes E., and Montalban C., 2017. Clinical features and management of non-gastrointestinal extranodal mucosa associated lymphoid tissue (ENMALT) marginal zone lymphomas. *Best Pract. Res. Clin. Hemaematol*. 30(1-2): 99-108.

Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008;22(3):487-495.

Matthews W., Jordan CT., Wiegand GW., Pardoll D., and Lemischka IR., 1991. A receptor tyrosine kinase specific to hemaopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. 65, 1143-1152.

Maurus K., Appenzeller S., Roth S., Kuper J., Rost S., Meierjohann S., et al., 2018. Panel sequencing shows recurrent genetic FAS alterations in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *J. Invest. Dermatol*. 138(7): 1573-1581.

McCabe, M. T. et al., 2012. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 492, 108–112.

McCann, K. J., Johnson, P. W., Stevenson, F. K. & Ottensmeier, C. H., 2006. Universal N-glycosylation sites introduced into the B-cell receptor of follicular lymphoma by somatic mutation: a second tumorigenic event? *Leukemia* 20, 530–534.

McCulloch EA., Siminovitch L., Till JE., Russell ES., and Bernstein SE., 1965. The cellular basis of the genetically determined hematopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld. *Blood*. 26(4): 399-410.

McGuire, E.A., Hockett, R.D., Pollock, K.M., Bartholdi, M.R., O'Brien, S.J. and Korsmeyer, S.J., 1989. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2124-2132.

McKenna HJ., Stocking KL., Miller RE., Brasel K., De Smedt T., et al., 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 95(11): 3489-97.

Melchers F., 1995. B cell differentiation in bone marrow. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76, S188-191.

Mellentin JD., Smith SD., and Cleary ML., 1989. *Lyl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia, codes for a protein with helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell*. 58, pp. 77-83.

Mendoza MC., Er EE., and Blenis J., 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36, 320-328.

Mereu E., Pellegrino E., Scarfo I., Inghirami G., and Piva R., 2017. The heterogenous landscape of ALK negative ALCL. *Oncotarget*. 8(11) : 18525-18536.

Mertz, J. A. et al., 2011. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 108, 16669–16674.

Messersmith WA., Shapiro GI., Cleary JM., Jimeno A., Dasari A., Huang B., et al., 2015. A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral  $\gamma$ -secretase inhibitor PF-03084014. *Clin. Cancer Res.* 21(1): 60-7.

Metcalf D., 1998. Regulatory mechanisms controlling hematopoiesis: principles and problems. *Stem Cells.* 16 Suppl 1:3-11.

Metcalf D., 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood.* 111, 485-491.

Mikaelian I., Blades N., Churchill GA., et al., 2004. Proteotypic classification of spontaneous and transgenic mammary neoplasms. *Springer Link.* 6, R668.

Mittrucker HW., Matsuyama T., Grossman A., Kundig TM, Poteer J., et al., 1997. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science.* 275, 540-543.

Moellering RE., Cornejo M., Davis TN., Del Bianco C., Aster JC., et al., 2009. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature.* 462(7270): 182-8.

Mollejo M., Camacho FI., Algara P., Ruiz-Ballesteros E., Garcia JF., and Piris MA., 2005. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol. Oncol.* 23(3-4): 108-18.

Montoto S., and Fitzgibbon J., 2011. Transformation of indolent B-cell lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 29(14): 1827-1834.

Mora E., Smith EML., Donohoe C., and Hertz DL., 2016. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am. J. Cancer Res.* 6, 2416-2430.

Morin, R. D. et al., 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genet.* 42, 181–185.

Morin, R. D. et al., 2011. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298–303.

Morris SW., Kirstein MN., Valentine MB., Dittmer KG., Shapiro DN., Saltman DL., and Look AT., 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nuclear protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 263(5151): 1281-4.

Muhlbacher V., Zenger M., Schnittger S., Weissmann S., Kunze S., Kohlmann A., et al., 2014. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. *Genes Chromosomes Cancer*. 53, 524-536.

Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catovsky D., 1991. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: natural history and response to therapy in 50 cases. *Br J Haematol*. 78(2):206-209.

Namen AE., et al., 1988. Stimulation of B cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 333, 751-753.

Navarro A, Clot G, Royo C, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Bikos V, Darzentas N, 2012. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*. 72(20): 5307-16.

Nemazee D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev. Immunol*. 17, 281-294.

Ng S-Y., Yoshida T., Zheng J., and Georgopoulos K., 2009. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity*. 30, 493-507.

Ngan B-Y, Picker LJ, Medeiros LJ, et al., 1989. Immunophenotypic diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma in paraffin sections: Co-expression of L60 (Leu-22) and L26 antigens correlates with malignant histologic findings. *Am J Clin Pathol.* 91:579-583.

Ngo VN., Young RM., Schmitz R., Jhavar S., Xiao W., Lim KH., et al., 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 470(7332): 115-9.

Nguyen-Khac F., Lambert J., Chapiro E., et al., 2013. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica.* 98, pp. 649.

Niebuhr B., Kriebitzsch N., Fischer M., Behrens K., Gunther T., et al., 2013. Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development. *Blood.* 122, 413-423.

Niir H., and Clark EA., 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12): 945-56.

Nishizumi H., Horikawa K., Mlinaric-Rascan I., and Yamamoto T., 1998. A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. *J. Exp. Med.* 187, pp. 1343-1348.

O'Neil J., Grim J., Strack P., et al., 2007. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathways activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* 204(8): 1813-1824.

Ochiai K., Maienschein-Cline M., Mandal M., Triggs JR., Bertolino E., Sclamas R., 2012. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat. Immunol.* 13, 300-307.

Oda T., Elkahloun AG., Pike BL., et al., 1997. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* (3):235-42.

Odejide O., Weigert O., Andrew A., Lane A., Toscano LD., Lunning MA., et al., 2014. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 123(9): 1293-1296.

Van Oers NSC., Love PE., Shores EW., and Weiss A., 1998. Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR- $\zeta$  – chain signaling motifs. *J. Immunol.* 160(1): 163-170.

Oettinger MA., Schatz DG., Gorka C., and Baltimore D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science.* 248(4962): 1517-23.

Okano M., Xie S., and Li E., 1998. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 26, pp. 2536-2540.

Okano M., Bell DW., Haber DA., and Li E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99, 247-257.

Okkenhaug K., Bilancio A., Farjot G., Priddle H., Sancho S., et al., 2002. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 delta PI 3-kinase mutant mice. *Science.* 297, 1031-1034.

Okosun, J. et al., 2014. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nature Genet.* 46, 176–181.

O'Neil J., Calvo J., McKenna K., Krishnamoorthy V., Aster JC., et al., 2006. Activating *Notch1* mutations in mouse models of T-ALL. *Blood*. 107(2): 781-785.

van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ., et al., 1989. Marginal zone lymphocytes in the lymph node. *Hum Pathol*. 20: 1225–1227.

Oswald F., Tauber B., Dobner T., Bourteele S., Kostezka U., Adler G., et al., 2001. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol. Cell. Biol*. 21(22): 7761-74.

Otero DC., Omori SA., and Rickert RC., 2001. Cd19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 276(2): 1474-8.

Ott G., Katzenberger T., Greiner A., et al., 1997. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res*. 57: 3944-3948.

Oyama T., et al., 2007. Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 9764-9769.

Pai SY., Truitt ML., Ting CN., Leiden JM., Glimcher LH., and HO IC., 2003. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity*. 19(6): 863-75.

Palomero T., Lim WK., Odom DT., Sulis ML., Real PJ., Margolin A., Barnes KC., et al., 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(48): 18261-6.

Palomero T., Hantschke M., Rutten A., Menzel T., Kempf W., et al., 2007. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma may exhibit both the t(14;18)(q32;q21) IGH/BCL2 and the t(14;18)(q32;q21) IGH/MALT1 translocation: an indicator for clonal transformation towards higher-grade B-cell lymphoma? *Am. J. Dermatopathol*. 29, pp. 231-236.

Palomero T, Couronne L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Abate F, Allegretta M, Haydu JE, et al., 2014. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet.* 46:166–170.

Papayannidis C., DeAngelo DJ., Stock W., Huang B., Shaik MN., Cesari R., et al., 2015. A Phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood Cancer J.* 5(9): e350.

Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW, Swerdlow SH, Ketterling RP, Knudson RA, et al., 2014. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood.*124(9):1473–80.

Parkhomchuk D., Borodina T., Amstislavskiy V., et al., 2009. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* (18):e123.

Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungstrom V, et al., 2015. Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin Cancer Res.* 21(18):4174-4183.

Pasqualucci, L. et al., 2011. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature.* 471, 189–195. Along with reference 9, this study reports on the frequent genetic alterations targeting the *CREBBP* and/or *EP300* genes, and functionally characterizes their role in lymphomagenesis.

Pasqualucci, L. et al., 2011. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature Genet.* 43, 830–837. References 8, 9 and 10 are the first reports describing the coding genomes of the most common B-NHLs, including DLBCL and follicular lymphoma.

Pasqualucci, L. et al., 2014. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 6, 130–140.

Patel JP., Gonen M., Figueroa ME., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J., et al., 2012. Pronostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366(12): 1079-89.

Paulsson K., and Johnson B., 2009. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 48, 637-660.

Paulsson K., Liljebjorn H., Biloglav A., Olsson L., Rissler M., et al., 2015. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genetics.* 47, 672-676.

Payne KJ., Medina KL., and Kincade PW., 1999. Loss of c-Kit accompanies B-lineage commitment and acquisition of CD45R by most murine B-lymphocyte precursors. *Blood.* 94(2): 713-23.

Paz PE., Wang S., Clarke H., Lu X., Stokoe D., and Abo A., 2001. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signaling proteins in T cells. *Biochem. J.* 356, 461-471.

Pear WS., Aster JC., Scott ML., Hasserjian RP., Soffer B., Sklar J., and Baltimore D., 1996. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J. Exp. Med.* 183(5): 2283-91.

Pear, WS and Radtke F., 2003. Notch signaling in lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* 15(2): 69-79.

Peled, J. U. et al., 2010. Requirement for cyclin D3 in germinal center formation and function. *Cell Res.* 20, 631-646.

Pelengaris S., Khan M., Evan G., 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer.* 2:764-776.

Pelosof R., Fairchild L., Huang C-H., et al., 2017. Prediction of potent shRNAs with a sequential classification algorithm. *Nature Biotechnology.* 35, 350-353.

Perez de Castro I, Diaz R, Malumbres M, Hernandez MI, Jagirdar J, et al., 2003. Mice deficient for N-ras : impaired antiviral immune response and T-cell function. *Cancer Res.* 63(7): 1615-22.

Peshon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, et al., 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180(5): 1955-60.

Petruta VF, Cuciureanu D, Diaconu LS, Vladareanu AM, and Pop CS, 2018. MALT lymphoma: epidemiology, clinical diagnosis and treatment. *J. Med Life.* 11(3): 187-193.

Peveling-oberhag J, Wolters F, Doring C, Walter D, Sellmann L, et al., 2015. Whole exome sequencing of microdissected splenic marginal zone lymphoma: discover novel tumor-specific mutations. *BMC Cancer.* 15: 773.

Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, Carbone A, Fantoni L, Ferrari S, et al., 2007. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 67(22):10703–10.

Pillai S, and Cariappa A, 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9(11): 767-77.

Pimentel H, Bray NL, Puente S, Melsted P, and Pachter L, 2017. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat. Methods.* (7): 687-690.

Pise-Masison CA, Radonovich M, Dohoney K, Morris JC, O'Mahony D, Lee MJ, et al., 2009. Gene expression profiling of ATL patients: compilation of disease related genes and evidence for TCF-4 involvement in BIRC5 gene expression and cell viability. *Blood.* 113:4016–26.

Piva R, Deaglio S, Fam`a R, et al., 2015. The Kruppel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia.* 29(2):503-507.

Planelles L, Medema JP, Hahne M, Hardenberg G., et al., 2008. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Curr Mol Med.* 8(8):829-44.

van der Plas DC., Smiers F., Hoefsloot LH., Lowenberg B., and Touw IP., 1996. Interleukin-7 signaling in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemic cells and murine BAF3 cells involves activation of STAT1 and STAT5 mediated via the interleukin-7 receptor alpha chain. *Leukemia.* 10(8): 1317-25.

Pon JR., and Marra MA., 2015. Driver and passenger mutations in cancer. *Ann. Rev. Patho. Mechanisms of Disease.* 10:25-50.

Porritt HE., Rumpf LL., Tabrizifard S., Schmitt TM., Zuniga-Pflucker JC., and Petrie HT., 2004. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity.* 20(6): 735-745.

Puente XS., Pinyol M., Quesada V., et al., 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 475:101-105.

Puente XS., Bea S., Valdes-Mas R., et al., 2015. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 526:519-524.

Pufall MA., 2015. Glucocorticoids and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 872:315-33.

Pui JC., Allman D., Xu L., DeRocco S., Karnell FG., Bakkour S., et al., 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity.* 11(3): 299-308.

Qi W., et al., 2012. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 21360–21365.

Quivoron C., Couronné L., Della Valle L., Lopez CK., Plo I., et al., 2011. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphopoiesis.

Radtke F., Wilson A., Stark G., Bauer M., van Meerwijk J., McDonald HR., and Aguet M., 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 10, 547-558.

Ramadani F., Bolland DJ., Garcon F., Emery JL, Vanhaesebroeck B., et al., 2010. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci. Signal*. 3, ra60.

Ramos JW, 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40: 2707-2719.

Rasmussen KD., and Helin K., 2016. Role of TET enzymes in DNA methylation, development and cancer. *Genes Dev.* 30, 733-750.

Rawson R Robert, 2002. Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Essays Biochem.* 38:155-68.

Reindl C., Quentmeier H., Petropoulos K., Greif PA., Benthaus T., et al., 2009. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin. Cancer Res.* 15, 2238-2247.

Rhee SG et Bae, YS, 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272(24): 15045-8.

Richter, J. et al., 2012. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nature Genet.* 44, 1316-1320.

Rimokh R., Magaud J-P., Berger F., Samarut J., Coiffier B., Germain D., and Mason DY., 1989. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *BJH*. 71(1): 31-36.

Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, et al., 2011. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood*. 117: 1595 – 1604.

Rizzo P., Miao H., D'Souza G., et al., 2008. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res*. 68:5226-5235.

Rochman Y., Kashyap M., Robinson GW., Sakamoto K., Gomez-Rodriguez J., et al., 2010. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *PNAS*. 107, 19455-19460.

Roessler S., Gvory I., Imhof S., Spivakov M., Williams RR., Busslinger M., et al., 2007. Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol. Cell. Biol*. 27(2): 579-94.

Rolink A., Grawunder U., Winkler TH., Karasuyama H., and Melchers F., 1994. IL-2 receptor  $\alpha$  (CD25/JAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int. Immunol*. 6, 1257-1264.

Rolink AG, Winkler T, Melchers F, Andersson J et al., 2000. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J Exp Med*. 191:23.

Roskoski, R., 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res*. 94, 9-25.

Rosnet O., Marchetto S., deLapeyriere O., and Birnbaum D., 1991. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene*. 6(9): 1641-50.

Rosnet O., Schiff C., Pébusque MJ., Marchetto S., Tonnel C., et al., 1993. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic stem cells. *Blood*. 82(4): 1110-9.

Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, et al., 2011. Alteration of BIRC3 and multiple other NF- $\kappa$ B pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood*. 118(18):4930-4934.

Rossi D., Vladimir T., Fangazio M., Bruscaggin A., Silva R., Spina V., et al., 2012. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of *NOTCH2* and other pathways regulating marginal zone development.

Roux, PP. Ballif BA., Anjum R., Gygi SP., and Blenis J., 2014. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 13489-13494.

Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig WD., et al., 1991. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 6: 1887–1893.

Rudiger T., Weisenburger DD., Anderson JR., Armitage JO., Diebold J., et al., 2002. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann. Oncol.* 13(1): 140-9.

Rule S., 2019. The modern approach to mantle cell lymphoma. *Hematological Oncology*. 37, Suppl. 1, 66-69.

Rummel MJ, Kaiser U, Balser C, et al., 2010. Bendamustine plus rituximab versus fludarabine plus rituximab in patients with relapsed follicular, indolent and mantle cell lymphomas - final results of the randomized phase III study NHL 2-2003 on behalf of the STIL. *Blood*. 2010; 116(Suppl. 1): Abstract 856.

Ruskoné-Fourmestraux A, Fischbach W, Aleman BM, Boot H, Du MQ, Megraud F, Montalban C, Raderer M, Savio A, Wotherspoon A., EGILS group.2011. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut*. 60(6):747-58.

Russell RJH., Petrovic J., Rausch M., et al., 2017. A unique B-cell regulome links Notch to Downstream oncogenic pathways in small B- cell lymphoma. *Cell Rep*. 21(3):784-797.

Ryan MB., and Corcoran RB., 2018. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 15, 709-720.

Ryan RJH., Petrovic J., Rausch DM., et al., 2017. A B cell regulatome links Notch to downstream oncogenic pathways in small B cell lymphomas. *Cell Reports*. 21(3):784-797.

Saadoun D, Suarez F, Lefrere F, et al., 2005. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood*. 105(1):74-76.

Sabo A., Kress TR., Pelizzola M., de Pretis S., et al., 2014. Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature*. 511(7510): 488-492.

Safavi S., Olsson L., Biloglav A., Veeria S., Blendberg M., et al., 2015. Genetic and epigenetic characterization of hydiploid acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 6, 42793-42802.

Saito H et al., 1998. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in cryptopatches. *Science*. 280, pp. 275-278.

Saito T., Chiba S., Ichikawa M., Kunisato A., Asai T., Shimizu K., et al., 2007. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development.

Salar A., Domingo-Domenech E., Estany C., Canales F., Gallardo F., et al., 2009. Combination therapy with rituximab and intravenous or oral fludarabine in the first line, systemic treatment of patients with extranodal marginal zone B-cell lymphoma. *Cancer*. 115 (22), pp. 5210-5217.

Salaverria A., Philipp C., Oschlies I., et al., 2011. Translocations activating *IRF4* identify a subtype germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*. 118(1): 139-147.

Sambandam A., Maillard I., Zediak VP., Xu L., Gerstein RM., et al., 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat. Immunol.* 6(7): 663-70.

Satoh Y., Matsumura I., Tanaka H., Ezoe S., et al., 2004. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J. Biol. Chem.* 279(24) : 24986-93.

Saunders AE., and Johnson P., 2010. Modulation of immune cell signaling by the leukocytes common tyrosine phosphatase CD45. *Cell. Signal.* 22, 339-348.

Savage KJ., Chhanabhai M., Gascoyne RD., Connors JM., et al., 2004. Characterization of peripheral T-cell lymphomas in a single North American Institution by the WHO classification. *Ann. Oncol. Offic. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15(10), pp. 1467-1475.

Scott EW., Simon MC., Anastasi J., and Singh H., 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 265(5178): 1573-7.

Scott EW, Fisher RC, Olson MC, Kehrli EW, Simon MC, Singh H., 1997. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 6:437–447.

Schatz JH, Horwitz SM, Teruya-Feldstein J, Lunning MA, Viale A, Huberman K, et al., 2015. Targeted mutational profiling of peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified highlights new mechanisms in a heterogeneous pathogenesis. *Leukemia*. 29(1):237–41.

Schebesta A., McManus S., Salvaggio G., Delogu A., Busslinger GA., and Busslinger M., 2007. Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*. 27(1): 49-63.

Schieber M., Gordon LI., and Karmali R., 2018. Current overview and treatment of mantle cell lymphoma. *F1000Res*. Pii: F1000 Faculty Rev-1136.

Schlegelberger B., Himmler A., Bartles H., Kuse R., Sterry W., and Grote W., 1994. Recurrent chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 78, 15-22.

Schlegelberger B., Zwingers T., Hohenadel K., Henne-Bruns D., Schmitz N., et al., 1996. Significance of cytogenetic findings for the clinical outcome in patients with T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *J. Clin. Oncol.* 14, 593-599.

Schop RF., Kuehl WM., Van Wier SA., et al., 2002. Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood*. 100, pp. 2996-3001.

Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG., et al., 1992. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 16:455–466.

Schmitz, R. et al., 2012. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120.

Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G. & Staudt, L. M., et al., 2014. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014282.

SEER Cancer Statistic Review, 1975-2010 – Previous version – SEER Cancer Statistics Review: [http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2010/index.html](http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2010/index.html).

Sela M., Bogin Y., Beach D., Oellerich T., Lehne J., Smith-Garvin JE., et al., 2001. Sequential phosphorylation of SLP-76 at tyrosine 173 is required for activation of T and mast cells. *EMBO J.* 30, 3160-3172.

Selkoe D., Kopan R., 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual Rev. Neurosci.* 26 : 565-97.

Servitje O., Muniesa C., Benavente Y., Monsalvez V., Garcia-Muret F., et al., 2013. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: response to treatment and disease-free survival survival in a series of 137 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69, pp. 357-364.

Shaffer AL., Yu X., He Y., Boldrick J., Chan E., et Staudt LM., 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 13(2):199-212.

Shaffer, A. L. 3rd, Young, R. M. & Staudt, L. M., 2012. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 565–610.

Shawber C., Nofziger D., Hsieh JJ., Lindsell C., Bogler O., Hayward D., and Weinmaster G., 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development.* 122(12): 3765-73.

Shi Y., Wang X., Zhuang Y., Jiang Y., Melcher K., and Xu HE., 2017. Structure of the PRC2 complex and application to drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 963-976.

Shukla V., and Lu R., 2014. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B lymphocytes. *Front Biol. (Beijing).* 9, 269-282.

da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, et al., 2015. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sezary syndrome. *Nat Genet.* 47(12):1465–70.

Simanshu DK., Nissley DV., and McCormick F., 2017. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell.* 170, 17-33.

Simoës BM., O'Brien CS., Eyre R., et al., 2015. Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH4-dependent cancer stem cell activity. 12:1968-1977.

Singh H., DeKoter RP., Walsh JC., et al., 1999. PU.1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64: 13-20.

Skene PJ., and Henikoff S., 2017. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *ELife.* 6:e21856.

Skinnider BF., Horsman DE., Dupuis B., and Gascoyne RD., 1999. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum. Pathol.* 30(7):803-8.

Smith KG., Tarlinton GM., Doody ML., Hibbs DT., et al., 1998. Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J. Exp. Med.* 187, pp. 807-811.

Smith MA, Gloeckler Ries LA, Gurney JG, Ross JA., 2000. Leukemia SEER Pediatric Monograph. Vol 1999. *Bethesda, Md: National Cancer Institute.*

Sood R., Kamikubo Y., and Liu P., 2017. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 129, 2070-2082.

Soulier J., Clappier E., Cavuela JM., Regnault A., Garcia-Peydro M., et al., 2005. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood.* 106(1): 274-86.

Spain LM., Guerriero A., Kunjibettu S., and Scott EW., 1999. T cell development in PU.1-Deficient mice. *J. Immunol.* 163(5): 2681-2687.

Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa JL, Brothers GM., et al., 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by tumor suppressor PTEN. *Cell*. 95, 29-39.

Stary S, V inatzer U, Mullauer L, et al., 2013. t(11;14)(q23;q32) involving IGH and DDX6 in nodal marginal zone lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2013. 43: 33 – 43.

Steeghs EMP., Boer JM., Hoogkamer AQ., Boeree A., de Haas V., et al., 2017. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Rep.* 9, 4634.

Stein K, Hummel M, Korbjuhn P, et al., 1999. Monocytoid B cells are distinct from splenic marginal zone cells and commonly derive from unmutated naive B cells and less frequently from postgerminal center B cells by polyclonal transformation. *Blood*. 94: 2800–2808.

Stepanek O., Draber P., Drobek A., Horejsi V., and Brdicka T., 2013. Nonredundant roles of Src-family kinases and Syk in the initiation of B-cell antigen receptor signaling. *J. Immunol.* 190, 1807-1818.

Streubel B, Seitz G, Stolte M, Birner P, Chott A, Raderer M., et al., 2006. MALT lymphoma associated genetic aberrations occur at different frequencies in primary and secondary intestinal MALT lymphomas. *Gut*. 55(11):1581-5.

Su., I-H., Basavaraj A., Krutchinsky AN., Hobert O., Ullrich A., et al., 2003. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* 4, 124-131.

Subar M., Neri A., Inghirami G., et al., 1988. Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma. *Blood*. 72:667-671.

Subramanian A., Tamayo P., Mootha VK., et al., 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. USA.* 102(43):15545-50.

Suire, S., A.M. Condliffe, G.J. Ferguson, C.D. Ellson, H. Guillou, K. Davidson, H. Welch, J. Coadwell, M. Turner, E.R. Chilvers, et al., 2006. Gbetagammias and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI3Kgamma signalling in neutrophils. *Nat. Cell Biol.* 8:1303–1309.

Sulis ML., Saftig P., and Ferrando AA., 2011. Redundancy and specificity of the metalloprotease system mediating oncogenic NOTCH1 activation in T-ALL. *Leukemia.* 25, 1564-1569.

Sungalee, S. et al., 2014. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J. Clin. Invest.* 124, 5337–5351.

Surh CD., and Sprent J., 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 372, 100-103.

Swat W., Montgrain V., Doggett TA., Douangpanya J., et al., 2006. Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. *Blood.* 107, 2415-2422.

Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., et al., 2008. WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: *IARC WHO Press.*

Swerdlow SH., Quintanilla-Martinez L., Willemze R., Kinney MC., et al., 2013. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders. Report of the 2011 society for hematopathology/European association for haematopathology workshop. *Am. J. Clin. Pathol.* 139, pp. 515-535.

Swerdlow SH., Campo E., Pileri SA., Harris NL., et al., 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 127(20): 2375-90.

Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., et al., 2017. (Eds.), WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4<sup>th</sup> ed). *Intl. Agency for Research on Cancer*, Lyon, pp. 232-235.

Taghon TN., David ES., Zuniga-Pflucker JC., and Rothenberg EV., 2005. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev.* V.19(8).

Takino H., Li C., Hu S., Kuo T-T., Geissinger HK., et al., 2008. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathological study of cases from Asia, Germany, and the United States. *Mod Pathol.* 21, pp. 1517-1526.

Tal N., Shobat C., Geron I., Bercovich D., and Izraeli S., 2014. Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 365-378.

Tamura T., and Ozato K., 2002. ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 22(1): 145-52.

Tan J. et al., 2009. Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginale zone B cell precursor competition for delta-like 1 splenic endothelial niches. *Immunity.* 30, 254-263.

Tanigaki K et al., 2002. Notch-RBPk signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cell. *Nature Immunol.* 3, 443-450.

Tartaglia M., Martinelli S., Cazzaniga G., Cordeddu V., Iavarone I., et al., 2004. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood.* 104(2): 307-13.

Tasian SK., Loh ML., and Hunger SP., 2017. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 130, 2064-2072.

Teras LR., DeSantis CE., Cerhan JR., Morton LM., et al., 2016. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA. Cancer. J. Clin.* 66, pp. 443-459.

Terwilliger T., and Abdul-Hay M., 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 7, e577.

Thieblemont C, Felman P, Berger F, et al., 2002. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin. Lymphoma.* 3(1):41-47.

Thieblemont C, Molina T, Davi F., et al., 2016. Optimizing therapy for nodal marginal zone lymphoma. *Blood.* 127(17):2064e71.

Till JE., and McCulloch EA., 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research.* 14, 213-222.

Till JE., and McCulloch EA., 1980. Hematopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 605, 431-459.

Ting CN., Olson MC., Barton KP., and Leiden JM., 1996. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature.* 384, 474-478.

Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E, et al., 2006. A clinicopathological study of nodal marginal zone B-cell lymphoma. A report on 21 cases. *Histopathology.* 48: 162 – 173.

Treon SP., Cao Y., Xu L., Yang G., Liu X., and Hunter ZR., 2014. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 123(18): 2791-6.

Trimarchi T., Bilal E., Ntziachristos P., Fabbri G., et al., 2014. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell*. 158(3): 593-606.

Troussard X, Valensi F, Duchayne E, et al., 1996. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. Groupe Francais d'Hématologie Cellulaire (GFHC). *Br J Haematol*. 93(3):731-736.

Trowbridge JJ., and Orkin SH., 2011. Dnmt3a silences hematopoietic stem cell self-renewal. *Nat. Genet*. 44, 13-14.

Tsang E, Giannetti AM., Shaw D., Dinh M., Tse M., et al., 2008. Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J. Biol. Chem*. 283, 32650-32659.

Tsapogas P., Mooney CJ., Brown G., and Rolink A., 2017. The cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Int. J. Mol. Sci*. 18.

Tsimberidou AM, Catovsky D, Schlette E, et al., 2006. Outcomes in patients with splenic marginal zone lymphoma and marginal zone lymphoma treated with rituximab with or without chemotherapy or chemotherapy *Cancer*. 107(1): 125-135.

Tsukamoto H., Irie A., Senju S., Hatzopoulos AK., Wojnowski L., and Nishimura Y., 2008. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol*. 38, 518-527.

Tussiwand R., Lee WL., Murphy TL., Mashayekhi M., KC W., et al., 2012. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*. 490(7421) : 502-7.

Tzoneva G., Perez-Garcia A., Carpentier Z., Khiabani H., et al., 2013. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* 19, 368-371.

Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R., et al., 1995. The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci.* 92:1709–1713.

Urbanek P., Wang ZQ., Fetka I., Wagner EF., and Busslinger M., et al., 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell.* 79, 901-912.

Uyttendaele H., Marazzi G., Wu G., Yan Q., Sassoon D., and Kitajewski J., 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene; is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development.* 122(7): 2251-9.

Vallisa D, Bernuzzi P, Arcaini L, et al., 2005. Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience. *J Clin Oncol.* 23: 468 – 473.

Valls E., Lobry C., Geng H., et al., 2017. BCL6 antagonizes NOTCH2 to maintain survival of human follicular lymphoma cells. *Cancer Discov.* 7(5):506-521.

Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., and Bilanges B., 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 329-341.

Vasmatzis G, Johnson SH, Knudson RA, Ketterling RP, Braggio E, Fonseca R, et al., 2012. Genome-wide analysis reveals recurrent structural abnormalities of TP63 and other p53-related genes in peripheral T-cell lymphomas. *Blood.* 120(11):2280–9.

Vazquez A., Khan MN., Sanghvi NR., Pater JL., Caputo JL., et al., 2015. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue of the salivary glands: a population-base study from 1994 to 2009. *Head Neck.* 37, pp. 18-22.

Verma, S. K. et al., 2012. Identification of potent, selective, cell-active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 1091–1096.

Vetter, I.R., Wittinghofer, A., 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294, 1299–1304.

Virchis A, Mehta A., et al., 1998. Splenic lymphoma with villous lymphocytes (SLVL) responding to 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Br J Haematol.* 100(3):609.

Vose J., Armitage J., Weisenburger D., et al., 2008. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J. Clin. Oncol.* 26.

Voulgarelis M., Ziakas PD., Papageorgiou A., Baimpa E., et al., 2012. Prognostic and outcome of non-hodgkin lymphoma in primary Sjogren syndrome. *Medecine.* 91, pp. 1-9.

Wakabayashi Y., Watanabe H., Inoue J., Takeda N., Sakata J., et al., 2003. Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 4, 533-539.

Wang J, Jani-Sait SN, Escalon EA, Carroll AJ, de Jong PJ, Kirsch IR, Aplan PD., et al., 2000. The t(14;21)(q11.2;q22) chromosomal translocation associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia activates the BHLHB1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:3497–3502.

Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L., et al., 2014. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 345(2):196-202.

Wang H., Zang C., Taing L., Arnett KL., Wong YJ., Pear WS., et al., 2014. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111(2): 705-10.

Wang C, Collins M, Kuchroo VK., et al., 2015. Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters? *Curr Opin Immunol*. 37: 6–10.

Watkins AJ., Hamoudi RA., Zeng N., et al., 2012. An integrated genomic and expression analysis of 7q deletion in splenic marginal zone lymphoma. *PLOS ONE*. 7(9): e44997.

Weber BN., Chi AW-S., Chavez A., Yashiro-Ohtani Y., et al., 2011. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature*. 476, 63-68.

Weijzen S., Rizzo P., Braid M., et al., 2002. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nature Medicine*. 8, 979-989.

Weinmaster G., Roberts VJ., Lemke G., 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development*. 113: 199–205.

Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G 1992. Notch2: A second mammalian Notch gene. *Development*. 116: 931–941.

Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, Gascoyne RD, Jaffe ES, MacLennan KA, et al., 2011. Peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood*. 117(12):3402–8.

Weiss A and Littman DR., 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 76, 263-274.

Wen L., et al., 2005. Evidence of marginal zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity*. 23, 297-308.

Wendorff AA., Koch U., Thomas F., et al., 2010. Hes1 is critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity*. 33(5): 671-84.

Weng AP., Ferrando AA., Lee W., Morris JP 4<sup>th</sup>, Silverman LB., et al., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 306(5694): 269-71.

Weng AP., Millholland JM., Yashiro-Ohtani Y., Arcangeli ML., Lau A., et al., 2006. c-MYC is an important direct target of Notch1 in T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. 20(15): 2096-2109.

Wilcox RA., 2017. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol*. 92, 1085-1102.

Wilson A et al., 2000. Cutting edge : essential for Notch1 in the development of both thymus-independent and -dependent T cells in the gut. *J. Immunol*. 165, pp. 5397-5400.

Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath RC., et al., 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 135, 1118-1129.

Wobser M., Maurus K., Roth S., Appenzeller G., Weyandt M., et al., 2017. Myeloid differentiation primary response 88 mutations in a distinct type of cutaneous marginal-zone lymphoma with a nonclass-switched immunoglobulin M immunophenotype. *Br. J. Dermatol*. 177, pp. 564-566.

Wolfer A., Wilson A., Nemir M., McDonald HR., and Radtke F., 2002. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta lineage thymocytes. *Immunity*. 16, 869-879.

Wotherspoon AC, Pan L, Diss TC, et al., 1992. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet*. 58:35-38

Wu L., Maillard I., Nakamura M., Pear W., & Griffin JD., 2004. The transcriptional co-activator Maml1 is required for Notch2 mediated marginal zone B cell development. *Blood*. 110, 3618-3623.

Xia Y., Brown L., Yang CY., Siciliano MJ., Espinosa R., et al., 1991. TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7 ;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(24).

Xue L., Chiang L., Kang C., and Winoto A., 2008. The role of PI3K-AKT kinase pathway in T-cell development beyond the beta checkpoint. *Eur. J. Immunol.* 38, 3200-3207.

Xue. K., Song J., Yang Y., Li Z., Wu C., Jin J., and Li W., 2016. PAX5 promotes pre-B cell proliferation by regulating the expression of the pre-B cell receptor and its downstream signaling. *Mol. Immunol.* 73, 1-9.

Yamanashi Y., Kakiuchi T., Mizuguchi J., Yamamoto T., and Toyoshima K., 1991. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science.* 251, 192-194.

Yang L., Bryder D., Adolfsson J., Nygren J., et al., 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloblasted transplant recipient. *Blood.* 105, 2717-2723.

Yashiro-Ohtani Y., Wang H., Zang C., Arnett KL., Bailis W., et al., 2014. Long-range activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111(46): E4946-53.

Yasuda T., Sanjo H., Pagès G., Kawano Y., Karasuyama H., et al., 2008. Erk kinase link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity.* 28, 499-508.

Yokozeki T., Adler K., Lankar D., and Bonnerot C., 2003. B cell receptor-mediated Syk-independent activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Ras, and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* 171, 1328-1335.

Yoo HY., Sung MK., Lee SH., Kim S., Lee H., et al., 2014. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46(4): 371-5.

Yoshida T., Toki T., Okuno Y., Kanezaki R., Shiraishi Y., et al., 2006. The landscape of somatic mutations in Dpwn syndrome-related myeloid disorders. *Nat. Genet.* 45, 1293-1299.

Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D, et al., 2002. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood.* 99(5):1505–11.

Yoshimura A., Naka T., and Kubo M., 2007. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454-465.

Zandi S., Mansson R., Tsapogas P., Zetterblad J., et al., 2008. EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of transcription factor network in common lymphoid progenitors. *J. Imuunol.* 181, 3364-3372.

Zandvoort A, Lodewijk ME, de Boer NK, Dammers PM, Kroese FG., Timens W et al., 2001. CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells. *Tissue Antigens.* 58: 234–242.

Zardawi SJ., Zardawi I., McNeil CM., et al., 2010. High Notch1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype. *Histopathology.* Vol. 56, Issue 3, pp. 286-296.

Zelent A., Greaves M., and Enver T., 2004. Role of TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 23, 4275-4283.

Zhang J., Jackson AF., Naito T., Dose M., Seavitt J., et al., 2011. Harnessing of nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat. Immunol.* 13, 86-94.

Ziegler JL, Beckstead JM, Volberding PA, et al., 1984. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.* 311: 565-570.

Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinellis N, Berti E, Baliva S, et al., 2006. Prognostic factors in primary cutaneous B cell lymphomas. The Italian Study Group for cutaneous lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 24, pp. 1378-1382.

Zinzani PL, Broccoli A. et al., 2017. Marginal Zone B-Cell Lymphomas. *Williams Haemathology*. Chapter 101.1–14.

Zriwil A, Boiers C, Kristiansen TA, Wittman L, Yuan J, et al., 2018. Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *Br. J. Haematol.* 183, 588-600.

Zucca A, Conconi A, Laszlo D, Lopez-Guillermo A, Bouabdallah B, et al., 2013. Addition of rituximab to chlorambucil produces superior event-free survival in the treatment of the patients with extranodal marginal zone-B-cell lymphoma: 5-year analysis of the IELSG-19 randomized study. *J. Clin. Oncol.* 31, pp. 565-572.

Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, et al., 1997. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med.* 127: 423–428.

Zullo A, Cerro P, Chios A, Andriani A, Balsamo G, Francesco VD, Bruzzese V, et al., 2016. A very unusual cause of dysphagia: mantle cell lymphoma. *Ann Gastroenterol.* 29(3):383-5.

Zweidler-McKay PA, DeAngelo DJ, Douer D, Dombret H, Ottmann OG, et al., 2014. The safety and activity of BMS-906024, a Gamma Secretase Inhibitor (GSI) with anti-Notch activity, in patients with relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): initial results of phase 1 trial. *Blood.* 124(21): 968.

Zwollo P., Arrieta H., Ede K., Molinder K., Desiderio S., and Pollock R., 1997. The Pax5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J. Biol. Chem.* 272, 10160-10168.

**Titre : L'étude des mécanismes moléculaires induits par l'activation de NOTCH2 dans les lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL)**

**Mots clés : Lymphome B, NOTCH2, Transcriptome, MYC, Cell survival**

Des études mutationnelles basées sur les patients atteints de lymphomes B de la zone marginale de la rate (SMZL) ont démontré que le récepteur Notch2 est mutée de façon spécifique et récurrente dans 25% des cas. Ainsi, ces études suggèrent l'importance de la voie de signalisation *NOTCH2* dans la pathogenèse de ces lymphomes. Cependant les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogenèse ne sont, à ce jour, pas élucidés. Par conséquent, étudier les mécanismes moléculaires induits par l'activation de *NOTCH2* permettrait une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'initiation et de la progression de la maladie et donc pourrait permettre d'établir des thérapies spécifiques et ciblées pour ces patients. L'objectif de ma thèse a été d'identifier les gènes cibles en aval de l'activation de *NOTCH2* induits dans les SMZL. Dans cette étude, nous avons identifié l'oncogène *MYC* comme étant un potentiel gène cible direct de *NOTCH2* induit dans les SMZL. Nous avons montré par un crible par ARN interférents que l'expression du gène *MYC* est requis pour la croissance et/ou la survie cellulaire. Nous avons également démontré que l'expression *MYC* restaure la survie des cellules tumorales lorsque l'activité de la voie *NOTCH* est inhibée par un traitement d'inhibiteur à la gamma-secretase. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'induction de l'expression de *MYC* est requise pour la prolifération et la survie des cellules tumorales dans les SMZL.

**Title: Study of molecular mechanisms induced by NOTCH2 signaling activation in splenic marginal zone lymphoma (SMZL).**

**Keywords : B lymphoma, NOTCH2, Transcriptome, MYC, Cell survival**

Mutational studies based on SMZL patients have demonstrated that *NOTCH2* signaling pathway is mutated in 25% of the cases. Hence, these studies have highlighted the importance of *NOTCH2* signaling in the pathogenesis. However, molecular mechanisms induced in the pathogenesis remains not elucidated. Therefore, deciphering molecular mechanisms induced by *NOTCH2* activation would allow a better understanding of molecular mechanisms involved in the initiation and the progression of the pathology and so would open avenues for designs of specific and targeted therapies for these patients. The aim of my PhD project was to identify *NOTCH2*-induced downstream target genes in SMZL. In this study, we have identified *MYC* oncogene as a potential direct *NOTCH2* target induced in SMZL. We have shown by RNA interference drop out screen that *MYC* expression is required for cell growth and/or survival. We have also demonstrated that *MYC* expression rescues tumor cell survival in the condition where NOTCH signaling is inhibited by GSI treatment. Hence, we have highlighted that the induction of *MYC* expression is required for cell proliferation and survival in SMZL.