



HAL
open science

Analyse et identification de variants des transcrits de c-MYC et implication de ses isoformes protéiques dans le développement des lymphomes B

Dina Ibrahim

► **To cite this version:**

Dina Ibrahim. Analyse et identification de variants des transcrits de c-MYC et implication de ses isoformes protéiques dans le développement des lymphomes B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0045 . tel-04051500

HAL Id: tel-04051500

<https://theses.hal.science/tel-04051500>

Submitted on 30 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.

Université de Limoges

ED 615- Sciences Biologiques et Santé

UMR CNRS 7276 – INSERM 1262 – CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Science Biologie Santé

Spécialité : Immunologie, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement

le **29 mars 2022**

Par **Dina IBRAHIM**

**Analyse et identification de variants des transcrits de
c-MYC et implication de ses isoformes protéiques dans
le développement des lymphomes B**

Thèse dirigée par *Pr Ahmad OULMOUDEN* (Université de Limoges, France) et *Pr Mona DIAB-ASSAF* (Université Libanaise, Liban)

JURY :

Président du jury

*Pr Jean FEUILLARD, PU-PH, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de
Limoges*

Rapporteurs

*Pr Frédéric DAVI, PU-PH, Hôpital Pitié-Salpêtrière AP-HP, Département d'Hématologie,
AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, UPMC Université Paris 06, Paris*

*Dr Jean-Luc VILOTTE, INRA-AgroParisTech, UMR1313 Génétique Animale et Biologie
Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas*

Examineurs

*Pr Danielle TROUTAUD, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de
Limoges*

Pr Bertrand LIAGRE, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges

Université de Limoges

ED 615- Sciences Biologiques et Santé

UMR CNRS 7276 – INSERM 1262 – CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Science Biologie Santé

Spécialité : Immunologie, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement

le **29 mars 2022**

Par **Dina IBRAHIM**

**Analyse et identification de variants des transcrits de
c-MYC et implication de ses isoformes protéiques dans
le développement des lymphomes B**

Thèse dirigée par *Pr Ahmad OULMOUDEN* (Université de Limoges, France) et *Pr Mona DIAB-ASSAF* (Université Libanaise, Liban)

JURY :

Président du jury

*Pr Jean FEUILLARD, PU-PH, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de
Limoges*

Rapporteurs

*Pr Frédéric DAVI, PU-PH, Hôpital Pitié-Salpêtrière AP-HP, Département d'Hématologie,
AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, UPMC Université Paris 06, Paris*

*Dr Jean-Luc VILOTTE, INRA-AgroParisTech, UMR1313 Génétique Animale et Biologie
Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas*

Examineurs

*Pr Danielle TROUDAUD, CNRS UMR7276, INSERM U1262, Université de
Limoges*

Pr Bertrand LIAGRE, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges

A tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont soutenue,

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information. »

Albert Einstein

« Etre heureux ne signifie pas que tout est parfait. Cela signifie que vous avez décidé de regarder au-delà des imperfections. »

Aristote

« La réussite est l'accumulation d'échecs, d'erreurs, de faux départs, de confusion et la volonté de continuer malgré tout. »

Nick Gleason



Remerciements

Parce qu'une thèse est loin d'être accomplie en solitaire, j'ai la chance de remercier les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'autres à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie en premier lieu le Pr Michel COGNE et à toute l'équipe merci de m'avoir accueillie parmi vous pour ces trois années de thèse. Grâce à vous ces années furent les meilleures qui soient.

J'exprime ma gratitude au Pr Jean FEUILLARD pour m'avoir permis de réaliser une thèse au sein de son laboratoire de recherche.

Mes remerciements vont également au Pr Ahmad OULMOUDEN qui a dirigé ce travail. Merci de m'avoir fait confiance en me confiant ce sujet de thèse, d'être patient en apportant des remarques pertinentes.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme. Danielle TROUTAUD qui j'ai eu la chance de travailler depuis quelques mois. Merci pour vos remarques, votre humilité, votre écoute, votre disponibilité et votre aide précieuse dans mon travail au quotidien. Merci aussi pour les encouragements et du soutien au cours de mes conditions les plus difficiles et pour le temps passé à corriger mes posters, mes présentations et bien sûr mon manuscrit de thèse.

Je remercie aussi particulièrement aussi le Pr Mona DIAB-ASSAF qui a codirigé aussi ce travail, pour son soutien tout au long de cette thèse, son aide pour mes projets à venir et d'examiner ce travail.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance envers les membres de mon jury Messieurs *Frédéric DAVI* et *Jean-Luc VILOTTE* d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je les remercie pour leurs remarques et commentaires qui vont permettre d'améliorer la qualité de ce manuscrit. Je remercie Monsieur Bertrand LIAGRE d'avoir pris le temps de m'écouter chaque fois que je frappais à votre porte, merci de me croire et d'examiner ce travail.

Je remercie sincèrement tous les étudiants et chercheurs présents ou passés de l'UMR CNRS 7276 pour les trois années à vos côtés. Et tous les gens qui ont laissé une touche lors de cette thèse en particulier Claire et Yves, qui étaient le meilleur soutien dans les plus difficiles moments.



Mention spéciale à mes copains et mes collègues Léa, Stécy, Kenza, Quentin, Millène, Camille, Nader, Israa, Jennifer, Charlotte, Catherine, Morgane, Lina, Imane, Zeinab, Batoul, Gemma, Melissa (surtout pour les réactifs 😊), Tiffany, Christelle, merci pour votre amitié, tous les bons moments partagés, touttttttt, dès le premier jour de mon arrivée, votre soutien, vos fous rires, et vos mots encourageants. Bon courage pour la suite, c'est votre tour bientôt.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans remercier mes amis hors labo. Chambier, Lubat, Françoise, Olivier, Isabelle GOUX, Khoulood, Nafiseh, Weddo, Modibo, Emmanuel, Adama (l'homme élégant et l'amour infini 🤍), Jose (the SHARP guy 😊), Darine, Jihad, Medard, Kevin, Julie, Charlotte et tous les employeurs du Cité Camille Guérin pour tous les bons moments qui ont changé les idées et le soutien dans les moments délicats! Un grand merci pour vos meilleurs moments, les soirées, les chansons et les folles blagues. Et surtout votre fameuse citation quand la manipe ne marche pas : « Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas ».

Assad, merci beaucoup pour ton soutien. Tu es un refuge permanent dans lequel j'ai déposé mes doutes et un cœur plein d'espoir qui me pousse vers le haut, qui me donne de la patience et qui m'a accordé la confiance. Je n'oublie jamais notre meilleur moment au bord de la mer. Cette thèse c'est aussi la tienne, ton nom mériterait de figurer à côté du mien sur la page de garde. Merci d'être toujours là.

Bilal, merci pour ton soutien. Tu es toujours là pour moi, dans les moments les plus durs et les plus beaux. Un frère et un ami unique. Chanceuse de t'avoir dans ma vie.

Imad, « Ya dob », je suis fière et heureuse de te compter parmi mes amis. Je te remercie de m'avoir soutenue comme tu l'as fait, avec beaucoup de patience, et d'énergie. Merci pour toutes les discussions, les délicieux plats et les grignotages du minuit. Sans toi cette thèse n'aurait pas été la même. Merci « Abou Mahmoud ».

Jean et Martine ROCHETTE, un grand merci d'être un refuge à l'étranger. Merci à tous les invitations, les bons moments et bons humeurs. Merci pour votre amour. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin, pour la partie particule et unique, un fort remerciement et reconnaissant va à ma famille. Maman et papa un immense merci pour votre soutien indéfectible malgré la distance, sans vous je ne serai pas ce que je suis. Je suis pleine de gratitude, d'amour inconditionnel, c'est vous qui



m'avez donné le goût de poursuivre ma thèse. Papa merci pour ta patience avec cette question « quand et est-ce-que tu reviendras cette année ? ». Maman, tu es ma ressource de vie et d'espoir avec tes mots réconfortants. Mes frères Hadi et Youssef gravés à jamais dans mon cœur, vous avez su me tendre la main, au moment où je n'allais pas bien. Et toi Issa, mon petit morceau de sucre qui à jamais cesses de demander sans ennui « quand tu reviendras, tu me manques ? ». Je ne m'étalerai pas plus, vous savez à quel point vous comptez pour moi.



Table de matières

REMERCIEMENTS	II
TABLE DE MATIERES.....	V
ABRÉVIATIONS	VII
TABLE DES ILLUSTRATIONS	XI
TABLE DES TABLEAUX.....	XIII
AVANT-PROPOS.....	XIV
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
I. L'ONCOPROTEINE C-MYC.....	2
1. <i>Le proto-oncogène c-MYC : localisation et structure</i>	2
2. <i>Structure de l'oncoprotéine c-Myc</i>	3
2.1. Généralités sur les protéines Myc	3
2.2. L'oncoprotéine c-Myc	4
3. <i>Les différentes fonctions de c-Myc</i>	6
3.1. c-Myc, un facteur de transcription.....	6
3.2. c-Myc favorise la formation de la coiffe de l'ARNm	8
4. <i>Fonctions cellulaires régulées par c-Myc</i>	10
4.1. Cycle cellulaire, prolifération et c-Myc.....	11
4.2. Croissance cellulaire, métabolisme et c-Myc.....	12
4.3. Angiogenèse et c-Myc.....	14
4.4. c-Myc et instabilité génomique.....	15
4.5. Différenciation, pluripotentialité et c-Myc.....	15
4.6. Apoptose et c-Myc.....	16
II. REGULATION DE L'EXPRESSION DE C-MYC.....	17
1. <i>Régulation transcriptionnelle de c-MYC</i>	18
1.1. Autorégulation de c-MYC.....	18
1.2. Effet de la structure de la chromatine au niveau du locus c-MYC	19
1.3. Influence du statut de méthylation du locus c-MYC.....	19
1.4. Régulation transcriptionnelle de c-MYC	20
1.4.1. Choix du promoteur	20
1.4.2. Voies de signalisation et facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation des promoteurs de c-MYC.....	22
2. <i>Régulation post-transcriptionnelle de c-MYC</i>	24
2.1. Régulations co-transcriptionnelles : Maturation des pré-ARNm de c-MYC.....	24
2.2. Régulation post-transcriptionnelles en lien avec la stabilité des ARNm	27
2.2.1. La régulation de la partie codante de l'ARNm.....	27
2.2.2. La régulation de la région 3'UTR de l'ARNm.....	27
3. <i>Traduction des ARNm de c-MYC</i>	29
3.1. Traduction cap-dépendante des isoformes de c-Myc	30
3.2. Traduction cap-indépendante des isoformes de c-Myc ou traduction IRES-dépendante.....	31
3.2.1. Localisation, structure et rôle de l'IRES des transcrits de c-MYC	31
3.2.2. Conditions d'activation de l'IRES de c-MYC	33
3.2.3. Activation de l'IRES de c-MYC et ITAFs	34
4. <i>Contrôle post-traductionnel de c-Myc</i>	36
4.1. Phosphorylation de c-Myc.....	36
4.2. Ubiquitination	40
4.3. Sumoylation	42
4.4. O-glycosylation.....	42
4.5. Acétylation	43
5. <i>Dégradation de c-Myc</i>	43
5.1. Clivage dépendant de la calpaïne.....	44



5.2. Dégradation par la voie protéasomique	44
III. C-MYC ET LYMPHOMES B	45
1. <i>c-Myc et développement des lymphocytes B dans les centres germinatifs.</i>	46
2. <i>c-Myc et lymphomes B chez l'homme</i>	48
2.1. Généralités sur les lymphomes	48
2.2. Altérations de c-Myc dans les lymphomes B non-Hodgkiniens.....	49
3. <i>Cas du lymphome de Burkitt</i>	50
3.1. Présentation générale du lymphome de Burkitt.....	50
3.2. Les traitements du lymphome de Burkitt	51
3.3. Altérations de c-MYC dans le lymphome de Burkitt.....	53
3.3.1. Translocations de <i>c-MYC</i>	53
3.3.2. Mutations de <i>c-MYC</i> et d'autres gènes impliqués dans la lymphogenèse	55
4. <i>c-MYC et autres lymphomes B non-Hodgkiniens : cas des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)</i>	57
4.1. Aspects morphologiques et phénotypiques.....	57
4.2. Sous-types et origines de DLBCL.....	58
4.3. Les altérations génétiques de c-MYC dans les DLBCL	59
4.4. Traitement actuel du DLBCL	60
5. <i>c-Myc et modèles de lymphomes murins</i>	61
5.1. Les modèles murins transgéniques.....	61
5.1.1. Les modèles murins transgéniques dans le locus IGH	61
5.1.2. Les modèles murins transgéniques dans le locus IGL	63
5.2. Autres modèles murins : cas des modèles d'étude de la méthylation du génome.....	64
OBJECTIFS.....	66
CHAPITRE II. RESULTATS.....	68
1. <i>Etude préliminaire : Méthylation du génome, c-MYC et lymphomes</i>	69
1.1. INTRODUCTION.....	69
1.2. MATERIELS & METHODES.....	71
1.2.1. Croisement et classification des souris	71
2. RESULTATS	72
2. <i>Article</i>	73
CHAPITRE III. DISCUSSION GENERALE/CONCLUSION/ PERSPECTIVES	74
REFERENCES	82
RESUME	110
ABSTRACT	110



Abréviations

5

5'LTR · 5' Long Terminal Repeat
5'UTR · 5' Untranslated Region

A

A · Agouti
aa · Amino-acid
ABC · Activated B-like
ADCC · Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADNr · Ribosomal DNA
Ag · Antigen
AID · Activation-induced cytidine deaminase
 α -KG · Alpha-ketoglutarate
ARE · AU-rich element
ARE-BP · ARE-binding proteins
ARF · ADP-Ribosylation Factor
ASP · Agouti signalling protein
AUF1 · AU-rich binding factor
A^{vy} · Agouti Viable Yellow
AZ2 · Antizyme 2

B

BCL2 · B-cell lymphoma 2 protein
BCL6 · B-cell lymphoma 6
BCR · B-cell receptor
BE · Barrier Element
BFM · Berlin-Frankfurt-Munich protocol
bHLH-LZ · basic-helix-loop-helix-leucine zipper
BL · Burkitt Lymphoma
Blimp1 · B lymphocyte induced maturation protein-1
B-NHL · B-cell non-Hodgkin lymphoma
BRD4 · Bromodomain protein 4

C

C/EBP α · CCCAT/Enhancer Binding Protein alpha

CA · Cleavage site
CAD · Carbamoyl phosphate synthase
Capn4 · Calpain 4
CAPN · Calpain
CBC · Cap-Binding Complex
CBP · cAMP-response-element-binding protein
CCND2 · Cycline D2
CD40-96 · Cluster of Differentiation 40-96
CDC · Complement-dependent cytotoxicity
CDK1-7-9 · Cyclin-dependent kinase 1-7-9
CDKN1A · Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
CFI/II · Cleavage Factor I/II
c-FLIP · Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme
CG · Germinal center, centres germinatifs
CK2 · Casein Kinase 2
c-MYCS · c-MYC Short
CNS · Central nervous system
CPM · Cyclophosphamid
CPSF · Cleavage / Polyadenylation Specificity Factor
CRB1 · Protein Crumbs homolog 1
CRD · Coding Region Determinant of instability
CRD-BP · CRD- Binding Protein
CREBBP · Histone Lysine Acetyltransferase
CSR · Class-switch recombination
CstF · Cleavage Stimulation Factor
CTCF · CCCTC-binding Factor
CTD · C-terminal Domain
CT-I₂ · CT-element

D

D · Deletions
DEL · Double-expressor lymphoma
DHFR · dihydrofolate reductase
DHL · lymphomes double-hit
DHX9 · DExH-Box Helicase 9
DLBCL · Diffuse Large B cell Lymphoma
DNMT1 · DNA(cytosine-5)-methyltransferase



Dnmt3a · DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3 α
DNMTs · DNA méthyltransferases
DZ · Dark Zone

E

E2A · immunoglobulin enhancer-binding factors
E2F · E2 Promotor Binding Factor
EFS · Event free survival
EGF · Epidermal growth factor
eIF2 · eukaryotic Initiation Factor 2
eIF4E · Eucaryotic Translation Initiation Factor 4E
EMS · E-Box Myc Site
EPO · erythropoietin
eS25 · Ribosomal protein S25
ESE · Exonic Splicing Enhancers
ESS · Exonic Splicing Silencers
EZH2 · Histone-Lysine N-Methyltransferase

F

FADD · FAS-associated death domain protein
FBP · Fuse Binding Protein
FBW7 · F-box & WD repeat domain – containing 7
FDC · Follicular dendritic cells
FIR · c
FOXM1c · Forkhead/winged helix transcription factor
FUSE · Far Upstream Element

G

GADD45, 153 · Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 45, 153
GCB · Germinal Center-like B
GCN5 · General control of amino-acid synthesis 5
GlcNAc · N-acetyl glucosamine
GLS · Glutaminase
GMALL · German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic leukemia
GOT · Glutamate-oxaloacetate transaminase
GRSF-1 · G-rich RNA sequence binding factor 1
GSK-3 β · Glycogène synthase kinase-3 β

H

H3-4 · Histone 3-4
HAT · Histone acetyltransferases
HCY · Homocystein
HDAC · Histone deacetylase
HGBL · High-grade B-cell lymphoma
HLH · Helix-loop-helix
hnRNP · Heterogeneous nuclear RNP
HNRNPU · Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U
Hsp27/70/90 · Heat shock proteins 27/70/90
HuR · Human antigen R

I

IAP · Intracisternal A-Particle
IGF1R · Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGF2BP-1 · Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1
IL 1/3/6 · Interleukin 1/3/6
INF- γ · Interferon gamma
Inr · Initiator element
IRE · Internal Regulatory Element
IRES · Internal Ribosome Entry Site
IRF-4 · Factor 4 interferon regulator
ISE · Intronic Splicing Enhancers
ISS · Intronic Splicing Silencers
ITAFs · IRES-trans acting factors

J

JAK · Janus kinase
JHDM · Jumonji C histone demethylases
JNK · c-jun-NH2-kinase

K

kb · kilobase
 κ E3' · κ 3' enhancer
 κ Ei · κ intron enhancer
KI · knock-in
KO · Knockout

L

LCR · Locus control region
LDH · Lactate dehydrogenase
LHT · Lymphome triple-hit



LZ · Light Zone, Leucine zipper

M

M · Mutations

m7G · 7-methyl-guanylate

MAPK · Mitogen-activated protein kinases

MAR · Attachment to the matrix

MAX · Myc-Associated factor X

MB · Myc Box homology

MDM2 · Mouse Double Minute 2 homolog

MINE · Myc Insulator Element

MIZ-1 · c-MYC-interacting zinc finger protein-1

mRNPs · messenger RiboNucleoProtein

N

NAD⁺ · nicotinamide adenine dinucleotide

NFY · Nuclear Transcription Factor Y

NF-κB · Nuclear Transcription Factor Y

NHEIII1 · Nuclease Hypersensitivity III 1

NLS · Nuclear Signal

O

Oct3/4 · Octamer-binding transcription factor 3/4

ODC · Ornithine decarboxylase

OGT · O-linked N-acetyl-glucosamine transferase

OMS · World Health Organization

ORF · Open Reading Frame

OXPHOS · phosphorylations oxydatives mitochondriales

P

p300/CBP · CREB Binding Protein

PABP · Poly(A)-binding protein

PABP II · Poly(A) Binding Protein II

PAK2 · P21 (RAC1) Activated Kinase 2

PAP · poly (A) polymerase

PCBP1/2 · poly(rC) binding protein 1/2

PDGF · Platelet derived growth factor

PEST · segment rich in proline, glutaminic acid, serine and threonine residues

PIC · Pre-initiation complex

PIK3 · kinase phosphatidylinositol-3-OH

PIN1 · Prolyl cis/trans isomerase

PKM2 · Muscle Pyruvate Kinase 2

Pol I · polymerase I

Pol II · RNA polymerase II

PP2A · protein phosphatase 2A

PPC · pre-promoter escape complex

PRMT5 · Protein arginine methyltransferase 5

PSF · PTB-associated splicing factor

PTB · Pyrimidine Tract Binding protein

PTB1 · Polypyrimidine tract-binding protein 1

p-TEFb · Positive Transcription Elongation Factor

PUMA · p53-upregulated modulator of apoptosis

R

R2 · ribonucleotide reductase

RACE · Rapid Amplification of cDNA ends

RBP · RNA-binding proteins

RE · Endoplasmic reticulum

RFTN1 · raftlin, lipid raft linker 1

RISC · RNA miRNA-induced silencing complex

RNGTT · RNA Guanylyltransferase and 5'-Phosphatase

RNMT – RAM · RNA guanine - N7 methyltransferase – RNMT-activating miniprotein

ROS · Reactive Oxygen Species

RT-PCR · Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

S

SAE1 · SUMO-activating enzyme subunit 1

SAH · s-adenosyl homocysteine

SAHH · S-adenosyl homocysteine hydrolase

SAM · S-adenosylmethionine

SCF · Skp1- Cullin1-F-box protein

SCF^{FBW7} · Skp1-cullin-1-F-box complex

SCF^{Skp2} · S-Phase Kinase Associated Protein 2

Ser62 · serine 62

SHM · Hypermutation somatique

Skp2 · S-Phase Kinase Associated Protein 2

SL1 · Selectivity factor 1

Sox2 · SRY-box 2

SOCS1 · Suppressor of cytokine signaling protein 1

SR · Serine-arginine-rich splicing factors



STAT3 · Signal Transducer and Activators of Transcription 3
SUMO · Small Ubiquitin- like Modifier **SWI** /
SNF · SWItch/Sucrose Non-Fermentable
SYNCRIP · Synaptotagmin Binding
Cytoplasmic RNA Interacting Protein

T

TAD · Transactivation domain
TBP · TATA-binding protein
TCA · Tricarboxylic acid cycle
TCF3 · Transcription Factor 3
TED · TET DNA demethylases
Tfh · T follicular helper cells
TFIIH · Transcription Factor II H
TGF-β · Transforming growth factor beta
THL · Triple Hit Lymphoma
Thr58 · Threonine 58
TIAR · T-cells intracellular antigen 1 related protein
TIF1A · Transcription initiation factor 1A
Tip60 · TAT-interactive protein 60
TLS · Tumor lysis syndrome
TNF · Tumor Necrosis Factor

TRAIL-R · Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand Receptor
TRRAP · Transformation/transcription domain associated protein
Tx · Translocations

U

UBF · Upstream Binding Factor
UCE · Upstream Control Element
UPS · Ubiquitin proteasom system
URE · Upstream Regulatory Element

V

VEGF · Vascular Endothelial Growth Factor
VIH · Human immunodeficiency virus

Y

YB-1 · Y-Box binding protein 1
YBX1 · Y-Box Binding Protein 1

Z

ZCCHC7 · zinc finger CCHC-type containing 7



Table des illustrations

Figure 1: Localisation et l'organisation du gène c-MYC human.....	1
Figure 2: Représentation schématique des protéines de la famille MYC.....	2
Figure 3: Organisation de la structure de la protéine c-Myc.....	3
Figure 4: Ensemble des fonctions cellulaires régulées par c-Myc.	5
Figure 5: c-Myc, un amplificateur non-linéaire d'expression agissant unanimement sur les gènes actifs.	6
Figure 6: Effet de c-Myc sur l'épigénome.	6
Figure 7: Un niveau élevé de c-Myc favorise la formation de la structure de la coiffe.	7
Figure 8: La relation entre c-Myc et le cycle cellulaire.....	11
Figure 9: c-Myc régule les voies métaboliques du glucose et de la glutamine.	12
Figure 10: Signalisations apoptotiques régulées par c-Myc.....	15
Figure 11: Mécanismes cellulaires contrôlés par c-Myc dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse.	16
Figure 12: Représentation de mécanisme d'auto-répression du promoteur P2 de c-Myc.	17
Figure 13: Représentation schématique du locus et de la structure du gène c-MYC humain.	18
Figure 14: Représentation de la structure du gène c-MYC et des différents transcrits.....	19
Figure 15: Mécanismes de régulation transcriptionnelle de c-MYC par le superenroulement de l'ADN.....	21
Figure 16: Principales voies de signalisation régulant la transcription de c-MYC.....	23
Figure 17: Maturation de l'ARNm chez les eucaryotes.	24
Figure 18: Représentation schématique du gène c-MYC, des transcrits et des 3 isoformes protéiques de c-Myc.....	28
Figure 19: Activation de la traduction dépendante de l'IRES en réponse à l'hypoxie et aux conditions de stress.	30
Figure 20: Modèle de la structure secondaire de l'IRES de c-MYC humain.....	31
Figure 21: Structure schématique de la protéine c-Myc avec les sites phosphorylés et ubiquitinylés visés par les modifications post-traductionnelles.....	37
Figure 22: Myc-Nick, moteur de réorganisation et de différenciation cytoplasmique.....	43
Figure 23: La demi-vie de c-Myc de la phosphorylation à la dégradation.	44
Figure 24: Activation des lymphocytes B et formation des centres germinatifs.	45
Figure 25: Représentation schématique des lymphomes survenant à différents stades de la différenciation des cellules B.	48
Figure 26: Coupe histologique du lymphome de Burkitt sporadique.	49
Figure 27: Positions des points de la cassure c-MYC/Ig et les types de translocations réciproques dans le lymphome de Burkitt.....	52
Figure 28: Spectre des mutations (cercles rouges) et des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, cercles bleus ; acétylation, cercles verts) qui touchent la séquence de la protéine c-Myc.	55
Figure 29: Événements mutationnels coopératifs associés à la lymphomagenèse induite par c-MYC et résultats en termes de fonctions biologiques.	56
Figure 30: Localisation des réarrangements de c-MYC dans le Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) et le lymphome de Burkitt (BL).....	57
Figure 31: Origine cellulaire et aberrations génétiques associées à chaque sous-type de DLBCL.	58
Figure 32: Représentations de différents modèles murins transgéniques dans le locus IGH et IGL.	62

Figure 33: L'allèle Avy et le spectre de couleur de pelage des souris Avy.....	70
Figure 34: Le lymphome de Burkitt s'est développé après 3 mois chez λc-MYC(Avy/a) (souris avec différents degrés de couleur jaune/tacheté/agouti) et λc-MYC (souris noire).....	71

Table des tableaux

Tableau 1: Les caractéristiques communes et distinctives du lymphome de Burkitt (BL), du lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) , et le lymphome non-classifiable (gray zone)...	57
Tableau 2: Nombre de souris ayant développé ou pas des tumeurs, classées par couleur de pelage.....	71



Avant-propos

L'implication des oncogènes cellulaires dans le développement et la progression des tumeurs est actuellement bien démontrée dans un certain nombre de cancers. L'objectif de ce mémoire consiste en l'étude du rôle des isoformes de *c-MYC*, oncogène cellulaire, dans les lymphomes B.

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont des sous-produits cytotoxiques des activités cellulaires normales. Le niveau intracellulaire de ROS est étroitement régulé dans les cellules normales. Cependant, l'hyperprolifération tumorale s'accompagne d'une dérégulation du métabolisme et d'une homéostasie redox aberrante. Pour s'adapter à diverses conditions de stress, les cellules cancéreuses adoptent une pléthore de reprogrammations énergétiques et métaboliques. Étant donné que *c-MYC* est considéré comme l'un des « gènes précoces immédiats » induits pendant la prolifération cellulaire et en raison de ses effets importants sur le métabolisme cellulaire, de nombreux cancers, y compris les lymphomes, sont devenus *c-MYC* dépendants.

Les recherches visant à mieux caractériser les dérégulations de l'oncogène *c-MYC*, souvent une surexpression et une production quantitative altérée de ses isoformes protéiques (*c-Myc1*, *c-Myc2* et *c-MycS*) émergent pour de nombreux cancers humains. En effet, l'homéostasie des cellules normales prolifératives nécessite un ratio entre les différents isoformes de *c-Myc*. Ainsi, dans les cellules de lymphomes B, le choix du cadre de lecture ouvert (traduction) de *c-MYC* est souvent déterminant. Aujourd'hui, tout le monde s'accorde à dire que ces isoformes sont produites à partir d'un ARNm unique par usage alternatif de codons d'initiation de la traduction. Particulièrement, il a été montré que l'isoforme *c-MycS* (Short), hautement exprimée dans les cellules cancéreuses, est traduite à partir de l'un de deux derniers codons AUG en aval du codon d'initiation canonique AUG de *c-Myc2*. Un autre mécanisme de la traduction a été décrit pour *c-MYC* : la traduction indépendante de la coiffe qui se produit par IRES (Internal Ribosome Entry Site) sans exiger la présence de la coiffe et en recrutant directement le ribosome au niveau du codon d'initiation.

Dans le cadre des travaux de notre thèse, nous avons d'une part étudié le rôle des régions 5'UTR (*5'Untranslated Region*) des ARNm de *c-MYC* dans la synthèse des isoformes de *c-Myc* et d'autre part analysé l'implication éventuelle de ces différentes isoformes dans le développement du lymphome B.



Chapitre I. Introduction



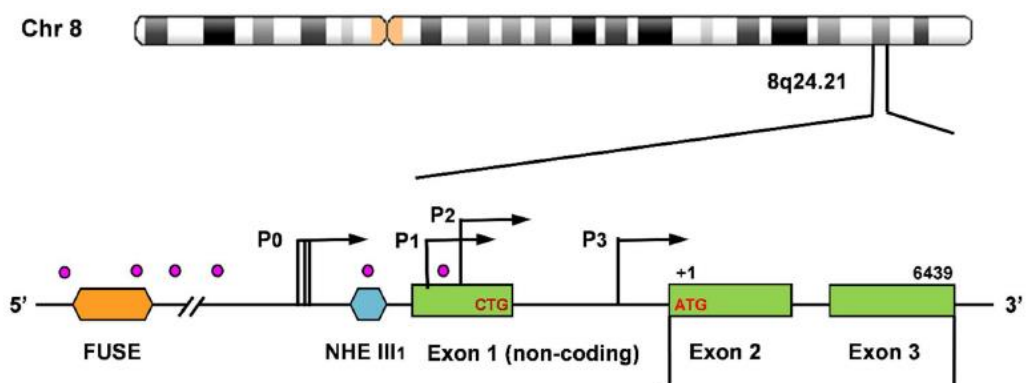


Figure 1: Localisation et l'organisation du gène c-MYC human.

Le premier plan de l'image représente le locus de c-MYC sur le chromosome 8. Le deuxième plan représente l'organisation de c-MYC. Les flèches indiquent les quatre promoteurs (P0, P1, P2 et P3), les rectangles représentent les exons et les introns sont indiqués par les traits. CUG et AUG sont des principaux codons initiateurs de la traduction. FUSE (Far Upstream Sequence Element) et NHEIII1 (Nuclease Hypersensitivity Element III 1) sont deux éléments cis qui forment des structures d'ADN non-canonique contrôlant la transcription de c-MYC (modifiée(Carabet, Rennie, and Cherkasov 2018)).



I. L'oncoprotéine c-Myc

1. Le proto-oncogène *c-MYC* : localisation et structure

Le gène *c-MYC* fait partie d'une famille de 3 membres : *c-MYC*, *MYCN* et *MYCL* codant respectivement pour c-MYC, N-Myc et L-Myc (Tansey 2014). Les gènes *MYCN* et *MYCL* ont été identifiés pour la première fois dans les neuroblastomes humains et les carcinomes pulmonaires à petites cellules, respectivement. Dans le génome humain, les gènes *c-MYC*, *MYCN* et *MYCL* ont été localisés sur différents chromosomes 8, 2 et 1, respectivement (Neel et al. 1982) et sur le chromosome 15 chez les souris (Bernard et al. 1983) (Park, Kim, et al. 2005). Tous les loci *MYC* sont organisés de manière similaire et les gènes comprennent trois exons. La relation entre ces trois membres de la famille des gènes *MYC* s'étend à l'architecture globale du gène et de sa transcription, ainsi que des régions spécifiques présentant une homologie de séquence considérable dans la région codante du gène.

c-MYC est formé de trois exons séparés par deux longs introns : l'exon 1 est non-codant et les exons 2 et 3 codent pour le facteur de transcription/oncoprotéine c-Myc. Chez l'homme, quatre promoteurs de *c-MYC* ont été identifiés : P0 (uniquement chez l'homme), P1, P2 et P3. P0 est localisé dans la région 5' non-traduite (Bentley and Groudine 1986). P1 et P2 se trouvent dans la région 5' du premier exon, contenant chacun une boîte consensus TATA (Broome et al. 1987) contrairement au P0 et P3. Le promoteur cryptique P3 est localisé dans l'intron 1 (Robert-Lezenes et al. 1987) (Figure 1). Deux sites majeurs d'initiation de la traduction ont été décrits, l'un en amont CTG à la fin de l'exon 1 et l'autre, ATG, situé au début de l'exon 2. Dans les cellules normales la majorité des transcrits sont produits à partir du promoteur fort P2 (75 à 90%) soutenu par sa boîte TATA optimale TATAAAAG et la présence de deux éléments Inr (Initiator element), et 10 à 25% des transcrits pour P1. Le promoteur P1 est fortement activé dans les cellules tumorales (shift P2/P1) (Wright et al. 1991) (Charlotte A. Spencer and Groudine 1991) (Strobl et al. 1993) (Luo et al. 2004). Seulement 5% de transcrits seront initiés à partir de P0 et P3. Comme nous le verrons dans un paragraphe dédié, ce gène est rigoureusement régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Charlotte A. Spencer and Groudine 1991).



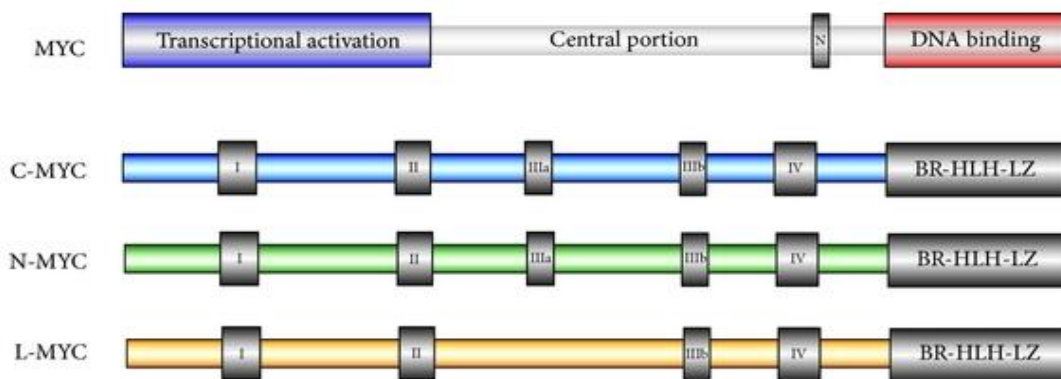


Figure 2: Représentation schématique des protéines de la famille MYC.

Une représentation structurelle de la protéine de Myc indiquant le domaine d'activation transcriptionnelle, la partie centrale, la séquence de localisation nucléaire (N) et la région basique impliquée dans la liaison à l'ADN après la formation d'un hétérodimère avec Max. Les séquences indiquées par I, II, III a/b, et IV indiquent les séquences conservées (Myc box) présentes dans les membres de la famille MYC (Tansey 2014).



2. Structure de l'oncoprotéine c-Myc

2.1. Généralités sur les protéines Myc

L'oncoprotéine c-Myc, est le produit du gène *c-MYC* qui a été considéré comme un analogue du produit de l'oncogène transformant *v-myc* de la myélocytomatose aviaire MC29 (Dalla-Favera et al. 1982) (Colby et al. 1983). Comme vu précédemment, *c-MYC* appartient à une famille d'oncogènes cellulaires qui présentent une homologie structurale et fonctionnelle formée de trois membres : *c-MYC* (surexprimé dans les tumeurs hématologiques et solides), *N-MYC* (découvert dans les cellules de neuroblastomes et le gliome) et *L-MYC* (amplifié dans les cellules de carcinome pulmonaire) (Nau et al. 1985) (Kohl et al. 1986) (R. K. Smith et al. 1992) (Figure 2). Les régions de similarité de séquence sont principalement dans les régions carboxy-terminales et amino-terminales (Tansey 2014) (Ruiz-Pérez, Henley, and Arsenian-Henriksson 2017). Les protéines N-Myc et L-Myc partagent une identité globale d'acides aminés de 43 % et 41 % avec c-Myc, respectivement. Pour les trois membres il existe deux régions hautement conservées codées par l'exon 2 (MBI, MBII), qui font partie du domaine d'activation transcriptionnelle. De plus, trois régions très conservées sont codées par l'exon 3, et englobe le domaine de dimérisation et le domaine de liaison à l'ADN. Deux autres régions d'homologie sont partagées entre c-Myc et N-Myc mais ne sont pas présentes dans L-Myc. Ces deux régions consistent en un site de phosphorylation de la caséine kinase II et un signal de localisation nucléaire. La perte de MBIIIa dans L-Myc pourrait jouer un rôle dans la réduction de son potentiel oncogène.

Concernant leur fonction, toutes les oncoprotéines Myc font partie d'une famille de « super activateurs transcriptionnels » qui régulent potentiellement la transcription au moins de 15% du génome entier (H. Chen, Liu, and Qing 2018). Ainsi, la localisation nucléaire est confirmée pour tous les membres de cette famille. Les trois oncoprotéines reconnaissent la même séquence d'ADN dite E-Box (CACGTG) (H. Chen, Liu, and Qing 2018) localisée dans le promoteur de gènes cibles, ce qui suppose une similarité dans les mécanismes par lesquels elles conduisent à la tumorigenèse (Blackwell et al. 1990) (Alex et al. 1992). Plusieurs études ont montré des contrôles réciproques d'expression de c-Myc et N-Myc via des boucles de régulation et des répressions de sites promoteurs (Nisen et al. 1986) (Breit and Schwab 1989).



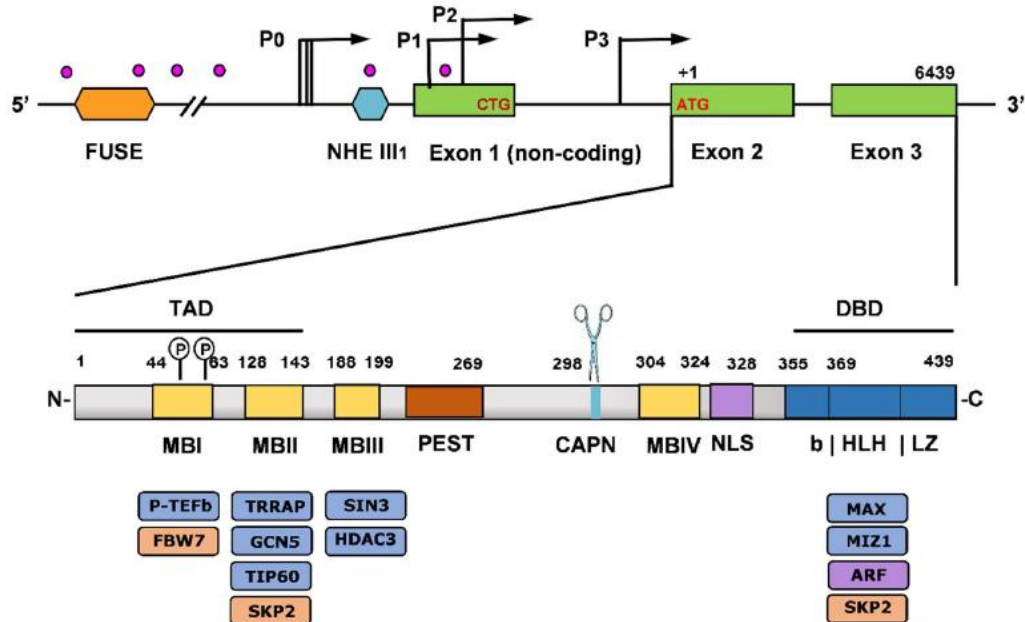


Figure 3: Organisation de la structure de la protéine c-Myc.

Les différentes régions de la protéine c-Myc sont indiquées, y compris les boîtes c-MYC (MBI, MBII, MBIII, MBIV), PEST: Proline (P), glutamic acid (E), serine (S), threonine (T), and aspartic acid (D); la séquence de localisation nucléaire (NLS), le domaine b-HLH-LZ (basic helix loop helix leucine zipper), ainsi que les principaux partenaires d'interaction nécessaires pour l'activité biologique de c-Myc: P-TEFb (Positive transcription elongation factor b) phosphoryle l'extrémité C-terminale de l'ARN polymérase II ; SKP2 (S-Phase Kinase Associated Protein 2) et FBW7 (F-box and WD repeat domain containing 7) ubiquitine ligases favorisent la dégradation protéasomique de c-Myc ; TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein) favorise la transcription des gènes cibles de c-Myc en recrutant des histones acétyltransférases (HAT) telles que TIPS60 et GCN5, le facteur associé au p300/CBP ; SIN3 (Paired amphipathic helix protein) et HDAC3 (Histone deacetylase) fonctionnent comme des complexes répresseurs de la transcription. CAPN (Calpaïne). Modifiée d'après (Carabet, Rennie, and Cherkasov 2018).



2.2. L'oncoprotéine c-Myc

Chez l'homme comme chez la souris, la présence de plusieurs promoteurs s'accompagne de la synthèse de 3 isoformes de la protéine c-Myc dont nous reparlerons dans le chapitre suivant: c-Myc1, c-Myc2 et une forme plus petite, c-MycS qui ne diffèrent que par leur partie N-terminale. La forme majoritaire est une protéine de 439 acides aminés (aa, amino-acids) de 64 kDa (c-Myc2 ou p64) et la forme minoritaire de 67 kDa possède 14 aa supplémentaires en position N-terminale (c-Myc1 ou p67) (Henriksson and Lüscher 1996) (Facchini et al. 1997) (Xiao et al. 1998). c-MycS est une protéine tronquée d'environ 100 aa au niveau de l'extrémité N-terminale (339 aa) et dont l'expression est augmentée dans des cellules tumorales (Claassen and Hann 1999) (D. J. Liao and Dickson 2000)

Le gène *c-MYC* produit un facteur de transcription nucléaire hautement conservé. De façon générale, il s'agit d'une phosphoprotéine qui est formée de trois domaines différents et de cinq sous-régions constituées des régions hautement conservées vues précédemment appelées boîtes d'homologie de c-Myc (MBI, MBII, MBIIIa/ b, MBIV) (Figure 3) (Kato et al. 1990) (Sakamuro and Prendergast 1999) (Revue(Scafuro et al. 2021)).

- Un domaine d'activation de la transcription ou TAD se situe dans sa partie N-terminale (c-Myc1 et c-Myc2). Il contient les deux régions très conservées nommées « Myc Box » MBI (résidus 47 à 62) qui est nécessaire pour la transactivation de gènes cibles via des séquences EMS (E-Box Myc Site) ou EFII enhancer ; MBII (résidus 188 à 199) qui est essentielle pour la transactivation et la transrépression des gènes cibles par le biais d'interactions protéines-protéines. MBI est un site d'accumulation de mutations augmentant la stabilité de la protéine et où les modifications post-transcriptionnelles ont lieu (T58 et S62) (Revue (Tansey 2014)). MBII est capable d'interagir avec TRRAP (Transactivation/transcription domain associated protein) recrutant des histone acétyltransférases (HAT) et d'autres protéines régulatrices de la transcription (Tip60, GCN5, p-TEFb...), ce qui identifie MBII comme un acteur clé pour l'initiation des tumeurs dépendantes de c-Myc (Kato et al. 1990). Le domaine TAD est formé essentiellement de résidus acide, la proline et la glutamine ; il change de conformation en présence de protéines partenaires (Andresen et al. 2012). Il permet l'élimination rapide de c-Myc suite à sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome dépendante (Salghetti, Kim, and Tansey 1999) (Gregory and Hann 2000).



- La région centrale contient trois Myc Box de résidues 188 à 324 (MBIIIa/b et MBIV) dont les séquences sont hautement conservées. De plus cette région contient un signal nucléaire puissant (NLS) de l'acide aminé 320 à 328 (Saphire, Bark, and Gerace 1998) et un autre signal nucléaire moins fort ou partiel (résidus 364 à 374) dont la délétion n'affecte pas la localisation nucléaire de c-Myc mais aboutit à une protéine c-Myc mutée inactive (C. V. Dang and Lee 1988). En interagissant avec les cofacteurs modificateurs de la chromatine comme des histones désacétylases (HDAC), MBIIIa est impliquée dans la transformation cellulaire *in vitro* et dans la tumorigenèse *in vivo* ; MBIIIb/MBIV sont impliqués aussi dans la liaison à l'ADN en raison de leur tendance à être situées près du domaine de liaison à l'ADN dans la structure tertiaire (Herbst et al. 2005) (V. H. Cowling et al. 2006) (Scafuro et al. 2021). Enfin, la région centrale de c-Myc contient aussi un segment riche en résidus proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST). La délétion de cet élément « PEST » montre son rôle crucial dans la stabilité de c-Myc sans réduire l'ubiquitination globale de la protéine (Gregory and Hann 2000).
- La partie carboxyl-terminale, des acides aminés 328 à 439 contient une région basique (domaine de liaison à l'ADN) suivie d'un motif hélice-boucle-hélice (HLH) et d'un domaine *leucine zipper* (LZ). Cette région avec le motif bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) sert de domaine d'hétérodimérisation avec d'autres protéines, comme MAX (Myc-Associated factor X) (Halazonetis 1993), MIZ-1 (c-MYC-interacting zinc finger protein-1) (Bédard et al. 2017), C / EBP, JUN, SWI / SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) (G J Kato, 1990) (Prendergast, 1999). Max appartient à la famille de facteurs de transcription de type b-HLH-LZ qui forment des hétérodimères via leur fragment C-terminal avec les protéines c-Myc, N-Myc et L-Myc. Ces dimères permettent la reconnaissance et la liaison à la boîte E (CACGTG) des gènes cibles. Une mutation au niveau de la valine 394 dans la région HLH-LZ de c-Myc abolit uniquement l'interaction c-Myc/MIZ (Wiese et al. 2013). Comme la liaison à l'ADN et la transactivation génique réalisées par c-Myc sont dépendantes de l'association avec MAX, MAX représente le partenaire obligatoire de c-Myc. Les hétérodimères protéiques se lient à l'ADN au niveau d'une séquence consensus canonique « 5'-CACGTG-3' » dite boîte enhancer (E-Box) dans la région promotrice des gènes cibles. Contrairement à MAX, l'homodimérisation de c-Myc est instable aux conditions physiologiques, ce qui explique l'absence de l'homodimère *in vivo* (Beaulieu, Castillo,



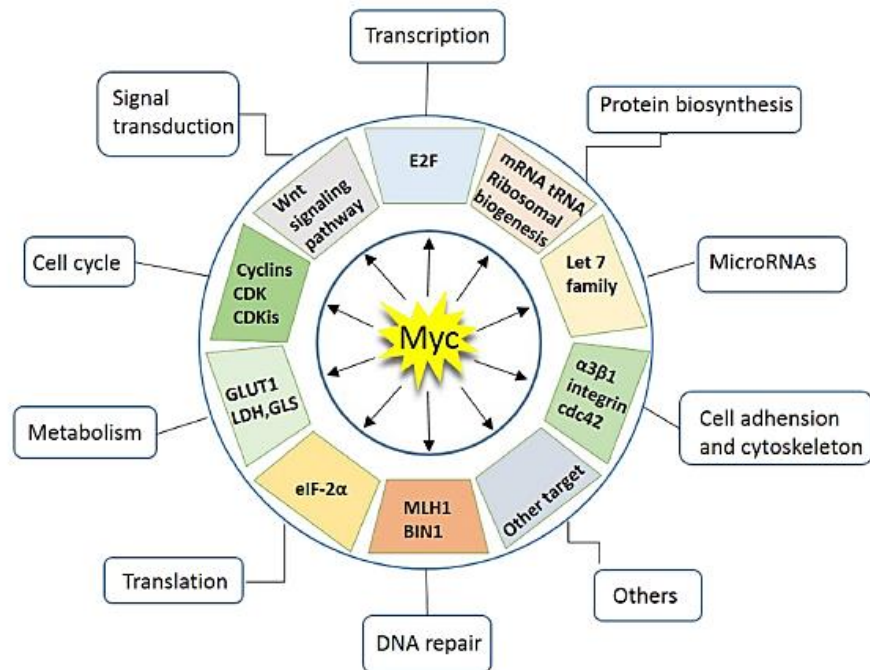


Figure 4: Ensemble des fonctions cellulaires régulées par c-Myc.

c-Myc régule un large panel de gènes, impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que le métabolisme, le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation (Chen, Liu, and Qing 2018)



and Soucek 2020). Cependant il a été montré que la séquence canonique E-box se lie préférentiellement à l'hétérodimère c-Myc/MAX plus qu'à l'homodimère MAX/MAX (Allevato et al. 2017).

3. Les différentes fonctions de c-Myc

c-Myc est un facteur de transcription qui régule directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, la traduction protéique, le cycle et le métabolisme cellulaire. Par ces fonctions c-Myc est le chef d'orchestre d'une grande variété de fonctions biologiques comme la prolifération, la différenciation, la survie ou la surveillance immunitaire (Figure 4). Comme nous l'avons signalé précédemment, les 2 isoformes les plus retrouvées sont c-Myc2 (p64) et à un degré moindre c-Myc1 (p67) ; bien qu'elles ne diffèrent que de 14 aa dans la région N-terminale, c-Myc1 et c-Myc2 ont des activités transcriptionnelles différentes (S. R. Hann et al. 1994a). Les 2 peuvent réaliser la transactivation de gènes cibles via des sites EMS, mais c-Myc1 peut aussi se lier à des séquences non canoniques. Ces activités différentes en tant que facteur de transcription expliquent des effets biologiques différents. Par exemple, la surexpression de c-Myc1, en absence de c-Myc2, inhibe la croissance cellulaire (S. R. Hann et al. 1994a), alors que la forme prédominante en condition physiologique, c-Myc2, est responsable de la croissance et la prolifération cellulaires. Ainsi en fonction des conditions biologiques, la synthèse en proportion différente de c-Myc1 et c-Myc2 pourra activer ou inactiver différents gènes cibles. Nous allons développer maintenant les principales fonctions de la forme majoritaire cellulaire, c-Myc2.

3.1. c-Myc, un facteur de transcription

Comme évoqué précédemment, MAX, le partenaire obligatoire de c-Myc, est une petite protéine de 18 KDa renfermant un domaine HLH-LZ (Blackwood and Eisenman 1991). Le complexe c-Myc/MAX reconnaît une séquence préférentielle de l'ADN dite E-Box Consensus canonical CACGTG et d'une façon concentration-dépendante c-Myc/MAX peut se lier avec une faible affinité à des sites de liaison non canoniques supplémentaires comme des variants de séquences E-Box (CATGTG) ou la séquence AACGTT sans E-box dans un contexte d'euchromatine (Allevato et al. 2017). c-Myc induit la tumorigenèse par l'activation d'autres oncogènes y compris *RAS* (Kortlever et al. 2017), *SRC*, *Notch* (Sanchez-Martin and Ferrando 2017) et souvent l'inactivation des suppresseurs de tumeurs (*p53*...) (Grzes et al. 2020). Plusieurs études montrent que c-Myc n'active pas un nouvel ensemble de gènes mais plutôt



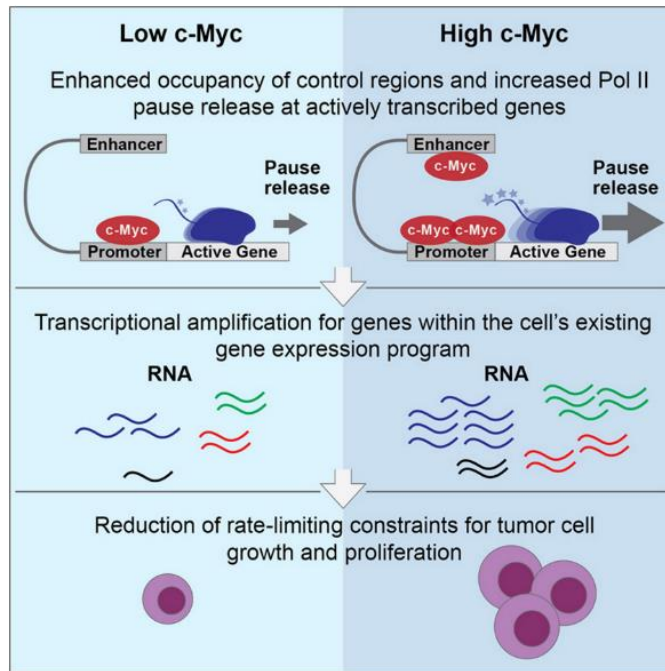


Figure 5: *c-Myc*, un amplificateur non-linéaire d'expression agissant unanimement sur les gènes actifs. Suite aux signaux de prolifération mitogéniques, *c-Myc* favorise la transcription des gènes associés à la croissance cellulaire en augmentant la transcription des gènes qui sont déjà activés (Lin et al. 2012).

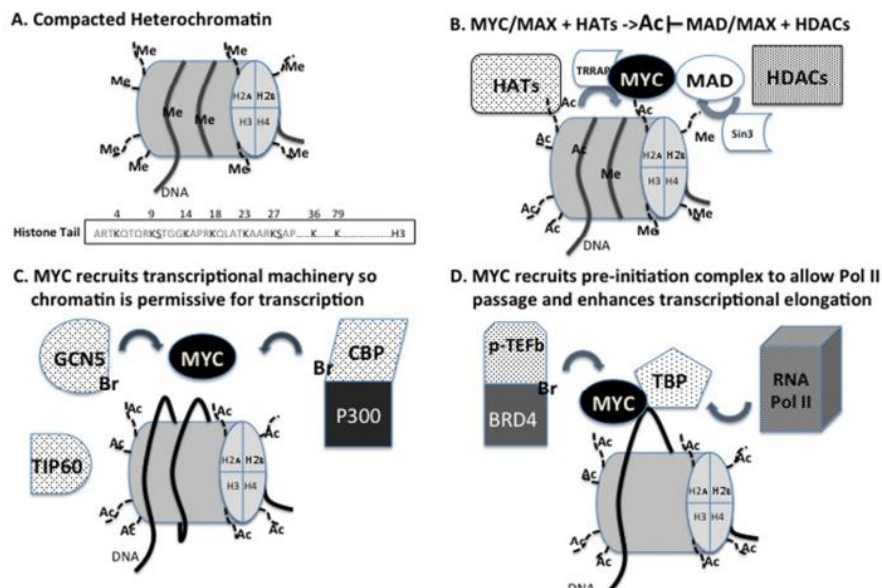


Figure 6: Effet de *c-Myc* sur l'épigénome.

(A). L'hétérochromatine compactée est une condensation de la chromatine caractérisée par le fait que l'ADN n'est pas accessible aux protéines de liaison à l'ADN ou à la machinerie transcriptionnelle, ce qui diminue la transcription. (B). *c-Myc* interagit avec TRRAP qui recrute des histones acétyltransférases (HATs) permettant une augmentation de la transcription. Par contre, cette fonction de *c-Myc* est inhibée par le recrutement des histones déacétylases (HDACs). (C) et (D). *c-Myc* recrute d'autres HATs tels que GCN5, TIP60, CBP/p300 ce qui permet d'augmenter l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. *c-Myc* peut se lier à TBP (TATA box binding protein), recruteur des éléments du complexe de pré-initiation transcriptionnel et des HATs améliorant l'initiation et l'élongation de la transcription (He et al. 2013).



amplifie l'expression génique existante (Figure 5) (C. Y. Lin et al. 2012) (Nie et al. 2012). A bas niveau, c-Myc se lie automatiquement aux motifs E-Box de gènes activés dans les cellules cancéreuses. Alors qu'à une haute expression, c-Myc reconnaît non seulement les E-Box mais aussi les amplificateurs (enhancers) de ces gènes. Il est aussi suggéré que c-Myc régleme favorablement ou défavorablement des gènes principalement impliqués dans la croissance cellulaire, la reprogrammation métabolique et la biogénèse des ARN (Sabò et al. 2014). Nous donnerons des exemples de gènes régulés par c-Myc en lien avec les fonctions cellulaires correspondantes et régulées par c-Myc.

Egalement, le facteur c-Myc permet la répression transcriptionnelle. Les hétérodimères c-Myc/MAX interagissent avec MIZ1 (Bédard et al. 2017, 1), NFY (Nuclear Transcription Factor Y) (Izumi et al. 2001). Ces interactions empêchent l'association du coactivateur p300 à MIZ1 et conduisent ainsi au recrutement de corépresseurs transcriptionnels tels que DNMT3a (DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 3 a) requis pour des méthylations de novo à l'échelle du génome (Brenner et al. 2005).

c-Myc peut aussi intervenir seule et favoriser la transcription par des régulations épigénétiques (remodelage de la chromatine) (Figure 6). Ainsi, c-Myc se lie et recrute des protéines clés comme TRRAP qui interagit avec c-Myc au niveau de son domaine MBII, ce qui permet le recrutement ensuite d'histones acétyltransférases (HAT), telles que GCN5 (General control of amino-acid synthesis 5) et Tip60, pour favoriser la transcription des gènes cibles.

De plus, c-Myc peut se lier aussi à un membre du complexe de pré-initiation de la transcription, TBP (TATA-binding protein) favorisant le recrutement de la polymérase II, et à la protéine CBP (cAMP-response-element-binding protein) du complexe coactivateur CBP/P300 qui présente notamment une activité HAT. Enfin, pour maintenir la transcription c-Myc peut se lier et recruter le complexe p-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor) /BRD4 (Bromodomain protein 4) pour catalyser la libération du promoteur et induire l'élongation transcriptionnelle. BRD4 est un régulateur épigénétique et transcriptionnel avec une activité intrinsèque HAT et kinase dans son extrémité carboxy et amino terminale respectivement. p-TEFb est impliqué dans la phosphorylation de la sérine 2 de la région CRD de la Pol II déterminant l'élongation des ARNm. A noter que, comme GCN5 et CBP, BRD4 possède des bromodomains (Br) qui reconnaissent des lysines acétylées (Figure 3). (He et al. 2013).



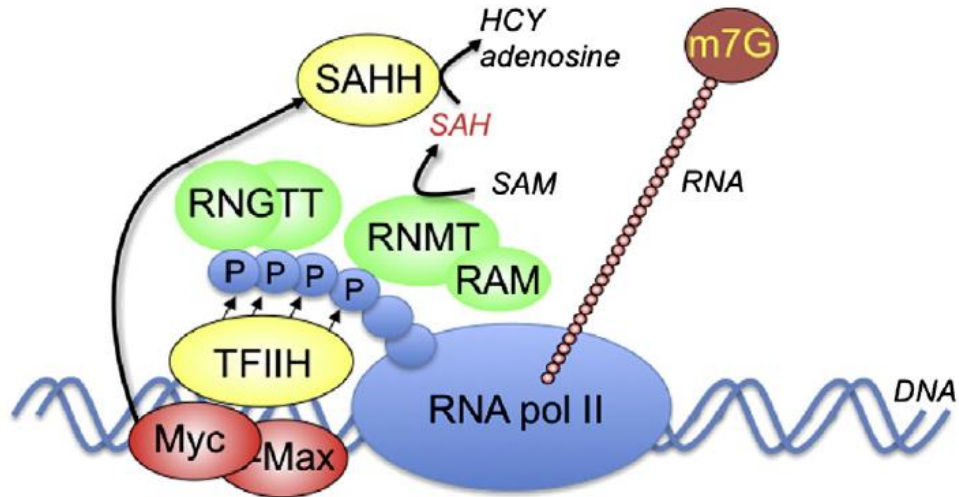


Figure 7: Un niveau élevé de c-Myc favorise la formation de la structure de la coiffe.

c-Myc favorise la phosphorylation de la CTD (domaine C-terminale) de l'ARN Pol II et le recrutement de TFIID. Ainsi, la Pol II phosphorylée peut recruter RNGTT (RNA Guanylyltransferase and 5'-Phosphatase) qui catalyse l'ajout de la coiffe et RNMT – RAM (RNA guanine - N7 methyltransferase – RNMT-activating miniprotein) qui ajoute un groupe méthyle, libéré par SAM, sur la guanosine en position N-7. La méthyltransferase est inhibée par le sous-produit SAH. Ainsi, c-Myc induit la synthèse de SAHH, l'enzyme qui hydrolyse SAH et dont il a été démontré qu'elle était nécessaire à la formation de la coiffe de l'ARNm et à la synthèse des protéines (Dunn and Cowling 2015).



3.2. c-Myc favorise la formation de la coiffe de l'ARNm

L'ajout d'une coiffe ou 5'cap à l'ARNm est une modification co-transcriptionnelle qui assure non seulement la stabilité des ARNm mais aussi la capacité de la traduction de l'ARN. En effet, l'initiation de la traduction commence chez les eucaryotes par la liaison du facteur d'initiation eIF4F à la coiffe des ARNm. Plus précisément, c'est la sous-unité eIF4E de ce complexe qui se lie à la coiffe, la sous-unité eIF4G étant une protéine adaptatrice stabilisant le complexe, et la sous-unité eIF4E une ARN hélicase qui apporte le complexe 43S sur l'ARNm. La formation de la coiffe consiste en l'ajout d'une guanosine sur l'extrémité 5' du premier nucléotide du pré-ARNm (5' cap) suivi de sa méthylation sur l'azote 7 de la base pour aboutir à la formation de la structure 7mG. La coiffe est liée par une liaison 5'-5' triphosphate au premier nucléotide transcrit de l'ARNm, donnant la structure 7mG(5')ppp(5')Np.

Cette structure de capuchon permet également un traitement en aval approprié du pré-ARNm en recrutant par exemple CBC (Cap-Binding Complex) et eIF4E (Eucaryotic Translation Initiation Factor 4E) qui sont nécessaires pour le déclenchement de la traduction (Dunn and Cowling 2015). L'ajout de la coiffe (Figure 7) est assuré par les enzymes « coiffantes », RNGTT (RNA Guanylyltransferase and 5'-Phosphatase) et RNMT – RAM (RNA guanine - N7 methyltransferase – RNMT-activating miniprotein) (Dunn, Lombardi, and Cowling 2017). Au cours des premiers stades de la transcription, les enzymes « coiffantes » sont recrutées sur l'ARN pol II phosphorylée sur la sérine-5 du domaine C-terminal. c-Myc recrute les facteurs TFIID (Transcription Factor II D) et p-TEFb qui phosphorylent ensuite le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN Pol II, une étape requise pour le recrutement des machines de capsulage (V. H. Cowling and Cole 2010). Par ses activités de triphosphatase et guanyltransférase, RNGTT catalyse l'addition d'une coiffe guanosine (GpppN) ; RNMT est la méthyltransférase qui détermine la méthylation de la guanosine en position N-7 à partir du donneur de méthyl SAM (s-adenosyl methionine), créant la coiffe m7G(5')ppp(5')Np. La méthylation à partir du donneur SAM génère le sous-produit SAH (s-adenosyl homocystéine) qui agit en tant qu'inhibiteur de la réaction de méthylation en entrant en compétition avec SAM pour la fixation sur le site actif. Finalement c-Myc favorise la formation de la coiffe en régulant positivement un catalyseur, la SAHH (S-adénosyl homocystéine hydrolase) qui hydrolyse SAH en adénosine et de l'homocystéine (HCY) (Fernandez-Sanchez et al. 2009).

c-Myc peut aussi agir indirectement sur la formation de la coiffe de l'ARNm. En effet, le domaine transactivation de c-Myc (d'une manière dépendante de MBII) peut induire une



élévation indépendante de la transcription des kinases du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Pol II) (CTD), telles que CDK7 et CDK9 (Cyclin-dependent kinase 7-9) et une augmentation globale de la phosphorylation de CTD (V. H. Cowling and Cole 2007).

Bien que la grande majorité des ARNm soient traduits de façon cap-dépendante en impliquant le complexe eIF4F, la mise en jeu de l'eIF4E varie avec les ARNm et il a été démontré que ce processus stimulait préférentiellement certains ARNs dits « eIF4E-sensitive » caractérisés par une structure secondaire étendue dans leur région 5' UTR (Koromilas, Lazaris-Karatzas, and Sonenberg 1992) (Bhat et al. 2015). Ces ARNm pour la plupart codent pour des protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire et l'angiogenèse comme les cyclines D1 et D3, le facteur de croissance vasculaire VEGF (Facteur de croissance endothélial vasculaire), la protéine anti-apoptotique Bcl2 (B - cell lymphoma 2 protein) et c-Myc lui même comme nous le verrons plus loin dans la partie « régulation de l'expression de c-Myc ». Finalement, il a été démontré que c-Myc/Max reconnaît la E-box dans la région promotrice de facteurs clés de la traduction cap-dépendante, comme eIF4E et eIF4A. Cela détermine un avantage supplémentaire dans la traduction cap-dépendante (Singh et al. 2019).

Par conséquent en favorisant ce processus cap-dépendant, c-Myc augmente la traduction de protéines fortement impliquées dans le processus tumoral.

3.3. Rôle de c-Myc dans la biogenèse des ribosomes

La localisation de l'ADN ribosomique (ADNr) n'est pas identique chez les mammifères. Chez l'homme, l'ADNr est localisé sur les bras courts des chromosomes 13-14-15-21 et 22, alors que chez les souris, il est porté par les chromosomes 11-12-15-16-18 et 19 (Gibbons et al. 2015). Les promoteurs de gènes ribosomiques comprennent deux essentiels éléments : UCE (Upstream Control Element) qui est l'élément de contrôle en amont et le promoteur basal (core promoter) (Moss and Stefanovsky 1995). La transcription des ADN ribosomiques et leurs assemblages ont lieu dans le nucléole et nécessite le rassemblement de complexes spécifiques au niveau de leurs promoteurs, notamment l'ARN polymérase I, le facteur de transcription UBF (Upstream Binding Factor), le facteur d'initiation de la transcription 1A (TIF1A) et le complexe de sélectivité 1 (SL1, Selectivity factor 1) (Bell et al. 1988) (Grummt 2003) (Sanij et al. 2008). La polymérase I (pol I) assure la synthèse d'ARN précurseur ribosomal qui peut donner les formes matures 5.8S, 18S, 28S. La polymérase III transcrit l'ARNm de l'unité 5S ribosomale. Les dernières études ont montré une dérégulation de la biogenèse et en particulier de la



transcription de gènes de ribosomes dans les cellules cancéreuses (Zhou et al. 2016) (Derenzini, Rossi, and Treré 2018) (Harold et al. 2021). Ces cellules, en pleine prolifération, exigent une intense production protéique ce qui détermine une forte augmentation de la biogenèse des ribosomes. L'oncoprotéine c-Myc, souvent dérégulée, intervient via différents mécanismes dans la régulation à la hausse de la synthèse des ribosomes (Ji et al. 2011). Elle est localisée dans le nucléole, lieu de la biogenèse et de l'assemblage de ribosomes. De plus, c-Myc recrute non seulement directement les éléments nécessaires à la transcription des ARN des ribosomes en interagissant par exemple avec les Polymérase I et III, mais aussi induit leur expression. En effet, en tant que facteur de transcription et sous forme d'un hétérodimère Myc/Max, il induit l'activation transcriptionnelle des gènes des ribosomes, *SL1*, *UBF*, *Pol I* et *III* soit en se liant aux motifs E-box des régions promotrices, soit en recrutant des facteurs comme TRRAP. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie « structure de la protéine », c-Myc interagit via son domaine MBII avec TRRAP qui recrute alors des histone acétyltransférases (HATs) aboutissant à une chromatine accessible et permissive pour la transcription (acétylation de l'Histone 3 et H4 de pol I) (Arabi et al. 2005) (Poortinga et al. 2011) (Campbell and White 2014) (Kalkat et al. 2018).

4. Fonctions cellulaires régulées par c-Myc

c-MYC, l'oncogène le plus souvent altéré dans les cancers humains, produit comme nous venons de le voir un facteur de transcription qui régule divers processus cellulaires jouant un rôle majeur dans la tumorigenèse comme la progression dans le cycle cellulaire, l'angiogenèse, la régulation de la différenciation, l'apoptose, la mobilité cellulaire, ou encore le métabolisme (Chi V. Dang et al. 1999) (Vita and Henriksson 2006) (Scafuro et al. 2021). Ainsi, les cellules ES *c-MYC*^{-/-} ont une capacité altérée à développer des cancers chez des souris immunodéprimées (Baudino et al. 2002).

Les souris déficientes en L-Myc ne révèlent aucune anomalie congénitale avec une viabilité et une reproductivité normales, suggérant ainsi la possibilité de complémentation du déficit en L-Myc par d'autres oncoprotéines Myc (Hatton et al. 1996). Des expériences sur des fibroblastes, portant sur l'inactivation d'un seul allèle de *c-MYC* ont montré une réduction de moitié de l'expression de c-Myc, entraînant un retard de trois heures dans l'entrée de la phase S. L'inactivation des deux allèles de *c-MYC* supprime l'expression de c-Myc sans augmentation compensatoire de N- ou L-Myc ; cette inactivation détermine une prolongation des phases G1



et G2, une phase normale de dédoublement mais avec une réduction significative de 2,5 fois du taux de synthèse protéique (Evan and Littlewood 1993) (Mateyak et al. 1997)(Obaya, Mateyak, and Sedivy 1999) (Alboran et al. 2001).

Plusieurs études ont montré des contrôles réciproques d'expression de c-Myc et N-Myc via des boucles de régulation et des répressions de sites promoteurs (Nisen et al. 1986) (Breit and Schwab 1989). Aux stades embryonnaires pré- et post-implantation précoce, c-Myc et N-Myc partagent les mêmes profils d'expression et sont fonctionnellement redondants. N-Myc peut remplacer c-Myc tout au long du développement, conduisant à des souris adultes viables et fertiles (Malynn et al. 2000). Par ailleurs, la délétion unique de c-Myc ou N-Myc, avant la gastrulation, n'a aucun effet sur le développement grâce à la compensation de fonction accomplie par l'autre forme de Myc présente. Les modèles murins KO (Knockout) pour *c-MYC* montrent qu'il est létal au stade embryonnaire (Stanton et al. 1992) (Davis et al. 1993). Ces expériences montrent l'intervention des protéines de la famille Myc de manière différentielle en ce qui concerne le développement ou la différenciation.

L'importance de cette protéine multifonctionnelle est à la hauteur de sa conservation chez les métazoaires, de *Drosophila melanogaster* à l'humain.

4.1. Cycle cellulaire, prolifération et c-Myc

La première propriété bien établie du gène *c-MYC* est sa capacité à transformer *in vitro* des cellules normales en cellules malignes.

Dans des conditions normales, le gène *c-MYC* fait l'objet d'une forte régulation au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, comme nous le détaillerons dans un paragraphe dédié. Dans les cellules non prolifératives, c-Myc est pratiquement indétectable (Zörnig and Evan 1996). Suite à une stimulation par un mitogène le taux d'ARNm de c-Myc augmente jusqu'à 20 à 40 fois en une heure et les cellules entrent dans la phase G1. Ensuite, le pic d'ARNm diminue progressivement pour revenir aux taux de base non stimulés en 48 heures (Reed, Alpers, and Nowell 1987). La demi-vie de c-Myc est extrêmement courte de l'ordre de 20 à 30 minutes, ce qui facilite l'arrêt des effets c-Myc au niveau des cellules et assure une augmentation rapide et transitoire de cette protéine (Ramsay, Evan, and Bishop 1984).

c-Myc est impliqué dans les différentes transitions de phase du cycle cellulaire, de repos G0 vers G1 puis la transition G1/S et la transition G2/M en régulant positivement l'expression de



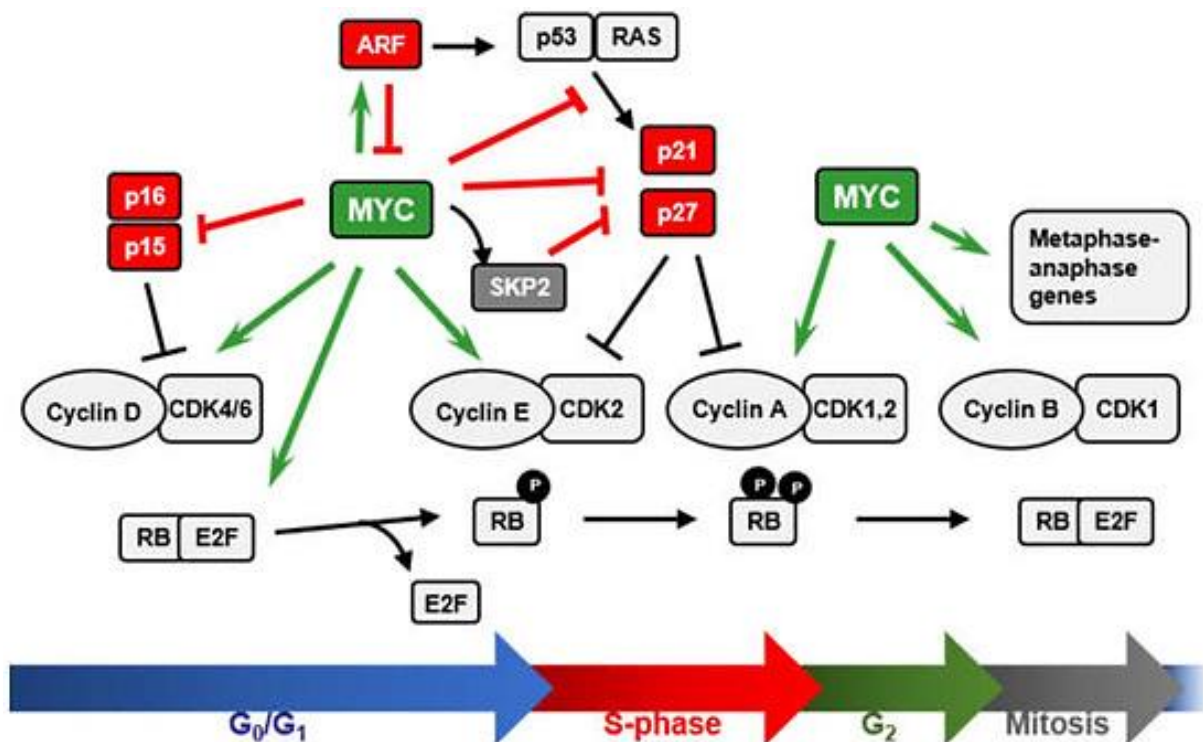


Figure 8: La relation entre c-Myc et le cycle cellulaire.

L'expression de c-Myc est maintenue tout au long du cycle cellulaire qui est régulé par des signaux positifs et négatifs. Ainsi, c-Myc induit l'expression de régulateurs positifs dont les Cdk, les cyclines et les facteurs de transcription E2F, en faveur de la progression du cycle cellulaire (flèches vertes). De plus, c-Myc antagonise l'activité des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 et p27 en bloquant la transcription de p21 ou en induisant Skp2, une protéine impliquée dans la dégradation de p27 (flèches rouges). La dérégulation de c-Myc induit ARF qui annule l'activité proliférative de c-Myc mais induit sa fonction apoptotique (García-Gutiérrez, Delgado, and León 2019).



nombreux acteurs positifs du cycle cellulaire tels que les complexes cycline-Cdk qui appartiennent à la famille des sérine/thréonine protéine kinases, ou des protéines impliquées dans la réplication (Figure 8) (García-Gutiérrez, Delgado, and León 2019). Plus précisément, c-Myc induit l'expression de cyclines (D, E A et B1) ainsi que des CDK (CDK1, 2, 4 et 6) et les facteurs de transcription E2F (E2 Promotor Binding Factor). Ainsi il a été trouvé que la très grande majorité des régulateurs positifs du cycle cellulaire sont des cibles du facteur de transcription c-Myc (Scafuro et al. 2021).

De plus, c-Myc régule aussi négativement des acteurs inhibiteurs du cycle cellulaire, comme les inhibiteurs de Cdk tels que p15 et p16 qui, en se liant à CDK4 et CDK6 respectivement empêchent leur association avec les cyclines D, ou comme p21 et p27 qui se fixent aux complexes cyclines/CDK déjà formés, ou encore d'autres facteurs tels que GADD45 et GADD153 (Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 45, 153) (Bretones, Delgado, and León 2015) (García-Gutiérrez et al. 2019).

Bien que c-Myc soit relié systématiquement à une augmentation de la prolifération et de la croissance cellulaire, la surexpression de c-Myc peut paradoxalement induire l'apoptose dans des conditions de stress cellulaire tel que la privation sérique (Zindy et al. 1998). Ce processus apoptotique met en jeu la protéine ARF (ADP-Ribosylation Factor) qui, activée par des signaux oncogéniques de c-Myc, induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1 et G2 et / ou l'apoptose par la régulation de la voie apoptotique ARF / MDM2 / p53 principalement (Hermeking and Eick 1994) (Quelle et al. 1995) (Weber et al. 2000). Cette apoptose observée pour une surexpression de c-Myc est considérée comme une mesure de sécurité pour éviter une prolifération incontrôlée des cellules due à des signaux soutenus de croissance cellulaire.

4.2. Croissance cellulaire, métabolisme et c-Myc

En relation avec son rôle dans la progression du cycle cellulaire et la prolifération, c-Myc régule de nombreuses voies métaboliques. Ainsi, pour se diviser les cellules doivent augmenter leur masse cellulaire et répliquer leur ADN, et donc elles ont besoin de nutriments, d'énergie et de protéines pour soutenir un haut taux de division. Dès le milieu des années 1990, il est apparu évident que c-Myc stimulait la croissance cellulaire (augmentation de la taille des cellules) en augmentant les synthèses protéiques. Ces effets sont dûs aux fonctions de c-Myc vues dans le chapitre précédent, avec son rôle dans la biogenèse des ribosomes, la traduction protéique notamment en favorisant la formation de la coiffe des ARNm.



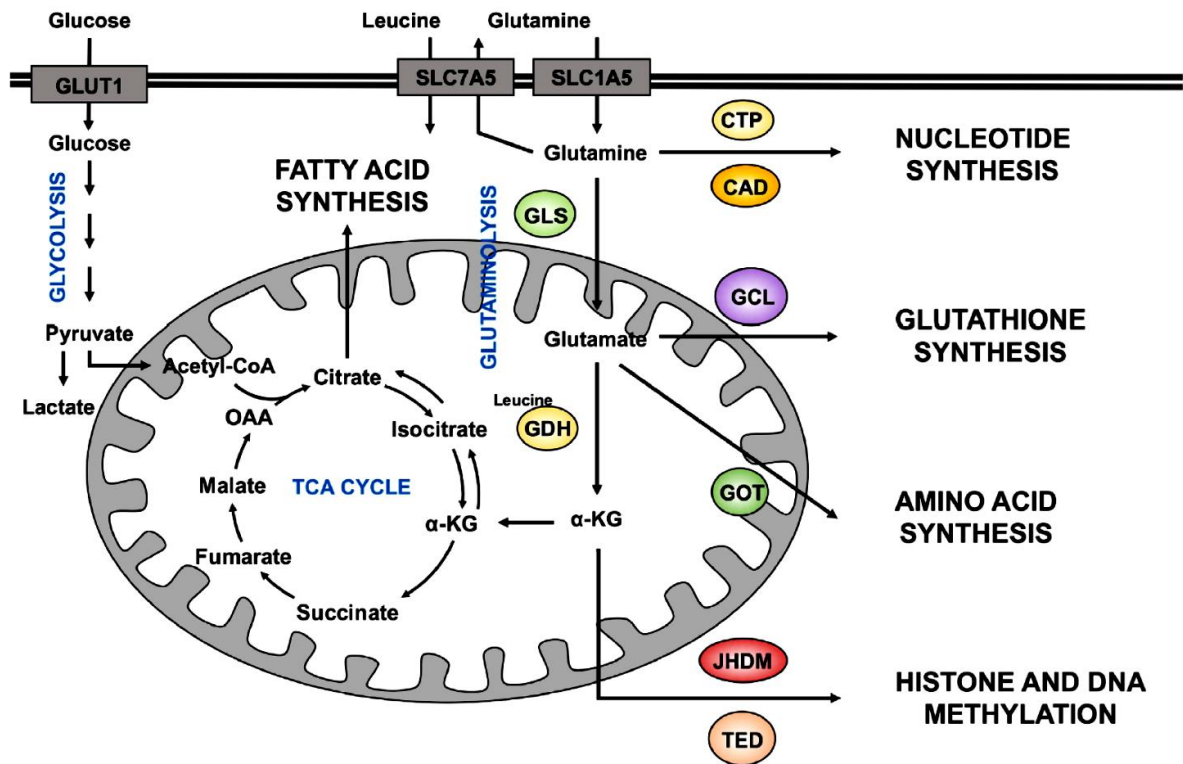


Figure 9: *c-Myc* régule les voies métaboliques du glucose et de la glutamine.

La cellule cancéreuse subit une réorientation métabolique pour assurer les besoins imposés par la prolifération rapide. La grande quantité de glucose introduite dans les cellules par le transporteur *Glut1* est extraite sous forme de lactate, dont il a été démontré qu'il favorise l'augmentation du métabolisme de la glutamine par un mécanisme dépendant de *c-MYC*. La glutamine est transportée dans la cellule par les transporteurs de la glutamine (*SLC1A5*). Elle peut servir à la biosynthèse des nucléotides médiée par la carbamoyl-phosphate synthetase 2 - aspartate transcarbamylase - dihydroorotase (*CAD*) et *CTP* (*CTP* synthetase) ou elle est transformée en glutamate par la glutaminase (*GLS*) puis est convertie en α -Kéto-glutarate (α -KG) pour entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique pour produire de l'énergie dans la mitochondrie. De plus, L'aminotransférase telle que la *GOT* (glutamate-oxaloacétate transaminase) favorise la synthèse des acides aminés à partir du glutamate. Le glutamate peut également être transporté vers le cytoplasme où il est converti en glutathione qui neutralise les espèces réactives de l'oxygène. L' α -KG est également un co-substrat des dioxygénases comme *JHDM* (*Jumonji C* histone demethylases) et *TED* (*TET* DNA demethylases) dans la régulation de la méthylation des histones et de l'ADN (Nguyen and Durán 2018).



De plus, c-Myc intensifie et orchestre une reprogrammation métabolique pour permettre aux cellules de supporter leur rapide expansion. Il stimule notamment en stimulant la glycolyse (effet Warburg) (C. V. Dang 2007) et le catabolisme de la glutamine (Bott et al. 2015), et augmente l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse de la mitochondrie (F. Li et al. 2005) et la synthèse nucléotidique (McMahon 2008), instaurant ainsi une nouvelle homéostasie cellulaire.

L'effet Warburg, documenté dans les années 1920, caractérise le comportement métabolique des cellules tumorales qui, en présence d'oxygène, n'oxydent pas le pyruvate issu de la glycolyse via les phosphorylations oxydatives mitochondriales (OXPHOS), mais le convertissent majoritairement en lactate (Effet Warburg ou glycolyse aérobie). Cet effet Warburg ne serait pas uniquement la conséquence d'une adaptation à un environnement hypoxique comme on le pensait initialement comme pour les tumeurs solides. Ainsi, il serait la traduction biochimique d'une réorientation métabolique des cellules en division permettant, par la glycolyse, de produire les précurseurs nécessaires à l'ensemble des synthèses des protéines, lipides et acides nucléiques. En effet, les cellules leucémiques peuvent fonctionner en glycolyse aérobie bien qu'elles ne soient pas confrontées à des conditions hypoxiques.

Dans ce contexte, c-Myc favorise la glycolyse en stimulant l'expression de gènes impliqués dans l'entrée du glucose au niveau des cellules comme le transporteur de glucose Glut1 et la plupart des enzymes de la glycolyse ou de régulateurs clés de la glycolyse comme l'isoforme A de la LDH (lactate dehydrogenase, LDH-A). La LDH-A catalyse la conversion du pyruvate en lactate, et ce processus est fortement accéléré au cours de l'hypoxie, comme l'entrée du glucose et la production d'ATP par la voie glycolytique. Cela génère davantage de NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) ce qui soutient la glycolyse anaérobie. Cette boucle positive de régulation assure aux cellules une source constante en ATP. Les cellules tumorales compensent le faible rendement énergétique de la glycolyse en captant avidement le glucose; ainsi les cellules transformées par les effets oncogéniques de c-Myc deviennent « addictes » au glucose et rapidement entrent en apoptose lorsqu'elles en sont privées (Shim et al. 1998) (Goetzman and Prochownik 2018) (Figure 9). L'amplification de c-Myc renforce également la voie aérobie favorisée par PKM2 (Pyruvate Kinase Musculaire 2) en amplifiant les facteurs d'épissage hnRNPA1, A2 et PTB (Polypyrimidine Tract-Binding Protein) qui basculent l'expression de la pyruvate kinase en faveur de l'isoforme PKM2 (David and Manley 2010).

La glutamine est une autre source physiologique de carbone et azote pour la prolifération des cellules cancéreuses. Une fois rentrée dans les cellules, la glutamine peut directement contribuer



à la synthèse de nucléotides, ou sera convertie en glutamate par une enzyme, la glutaminase. Le métabolisme mitochondrial du glutamate participe notamment à la synthèse d'acides aminés, et de lipides (Figure 9). De la même façon que pour le glucose, les cellules transformées sous l'influence de c-Myc présentent un « appétit » important pour la glutamine et augmentent leur métabolisme de la glutamine (P. Gao et al. 2009). Cet effet, qui va rendre les cellules tumorales dépendantes de la glutamine pour leur survie, s'explique aussi par le rôle de facteur de transcription de c-Myc qui régule l'expression des gènes d'enzymes importantes dans ce métabolisme. Ainsi, c-Myc induit la dégradation de la glutamine, comme source anabolique de carbone et d'azote, par stimulation de l'expression du gène de la glutaminase qui convertit la glutamine en glutamate. Ce dernier est ensuite converti en α -Kétoglutarate au niveau mitochondrial et rentre alors dans le cycle TCA (tricarboxylic acid cycle). Ce cycle va permettre de fournir à la cellule des précurseurs pour la biosynthèse de lipides. Ainsi, les cellules cancéreuses deviennent dépendantes de la glutamine et entrent en apoptose quand la glutamine est retirée du milieu, leur conférant une dépendance énergétique (Yuneva et al. 2007) (T.-L. Nguyen and Durán 2018).

Finalement, et comme nous venons de le voir, le fait que c-Myc contrôle et supervise la production d'énergie, le métabolisme, les synthèses protéiques et la progression du cycle cellulaire explique que beaucoup de cellules tumorales soient dépendantes de c-Myc pour leur survie et leur croissance.

4.3. Angiogenèse et c-Myc

La vascularisation est une porte d'accès non seulement aux nutriments mais aussi aux cellules cancéreuses migratoires qui envahissent des sites distants en menant aux développements des métastases. Le facteur de croissance VEGF surexprimé par c-Myc, induit une augmentation de la vascularisation, ce qui confère un avantage indéniable aux cellules tumorales par un apport constant d'oxygène et de nutriments nécessaire pour fournir l'énergie requise à une croissance rapide (Whitfield and Soucek 2012). Deux autres protéines essentielles à l'angiogenèse sont régulées par c-Myc : la thrombospondine est réprimée et l'angiopoïétine 1 et 2 sont régulées à la hausse, assurant la néovascularisation qui prend en charge les nouvelles exigences et besoins de cellules cancéreuses (Baudino et al. 2002).



4.4. c-Myc et instabilité génomique

La dérégulation de c-Myc pourrait induire une instabilité génomique via l'induction de dommages à l'ADN et la production des espèces réactives oxygénées (ROS) (Vafa et al. 2002). En effet, une prolifération aberrante des cellules les expose à des événements génétiques anormaux caractérisant le stress de réplication. c-Myc affecte le nombre de copie de plusieurs gènes associés à l'instabilité génomique tels que *DHFR* (dihydrofolate reductase) (Denis et al. 1991), le gène de la ribonucléotide réductase (*R2*) (Kuschak et al. 1999), de la carbamoyl phosphate synthase, aspartate transcarbamylase, dihydroorotase CAD (Eberhardy and Farnham 2001) (F. Kuttler and Mai 2006) (Kuzyk and Mai 2014). L'amplification de ces gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN et la progression du cycle cellulaire procure un avantage prolifératif aux cellules qui présentent ces amplifications, et une résistance à certaines drogues des chimiothérapies telles que le méthotrexate (Denis et al. 1991). Une étude réalisée par Rockwood et ses collègues a décrit la présence de recombinaisons illégitimes, pouvant mener à des translocations, délétions ou inversions, ainsi que des réarrangements chromosomiques lors de la dérégulation de *c-MYC* (Rockwood et al. 2002). Cette instabilité génomique accélère les altérations génétiques et l'accumulation des mutations qui confèrent aux cellules cancéreuses un avantage significatif en termes de prolifération et de survie (Kuzyk and Mai 2014).

4.5. Différenciation, pluripotentialité et c-Myc

c-Myc instruit le cycle cellulaire, le métabolisme et le paysage épigénétique, contribuant à la création des conditions favorisant la pluripotentialité. L'expression constitutive de c-Myc dans les cellules souches de kératinocytes conduit à une inhibition de la différenciation et une induction de la prolifération (Gandarillas and Watt 1997). La délétion de c-Myc *in vitro* et *in vivo* favorise la différenciation des cellules souches embryonnaires (Cartwright et al. 2005) (K. N. Smith, Singh, and Dalton 2010) (Fagnocchi et al. 2016). Par l'acétylation globale des histones et la reprogrammation nucléaire, c-Myc collabore avec les facteurs de transcription Oct3/4 (*Octamer-binding transcription factor 3/4*), Sox2 (*SRY-box 2*) permettant ainsi à Oct3/4 et Sox2 de se lier à leurs locus cibles spécifiques et de convertir des fibroblastes murins et humains en cellules souches pluripotentes semblables à des cellules souches embryonnaires (Takahashi and Yamanaka 2006) (Varlakhanova et al. 2010).



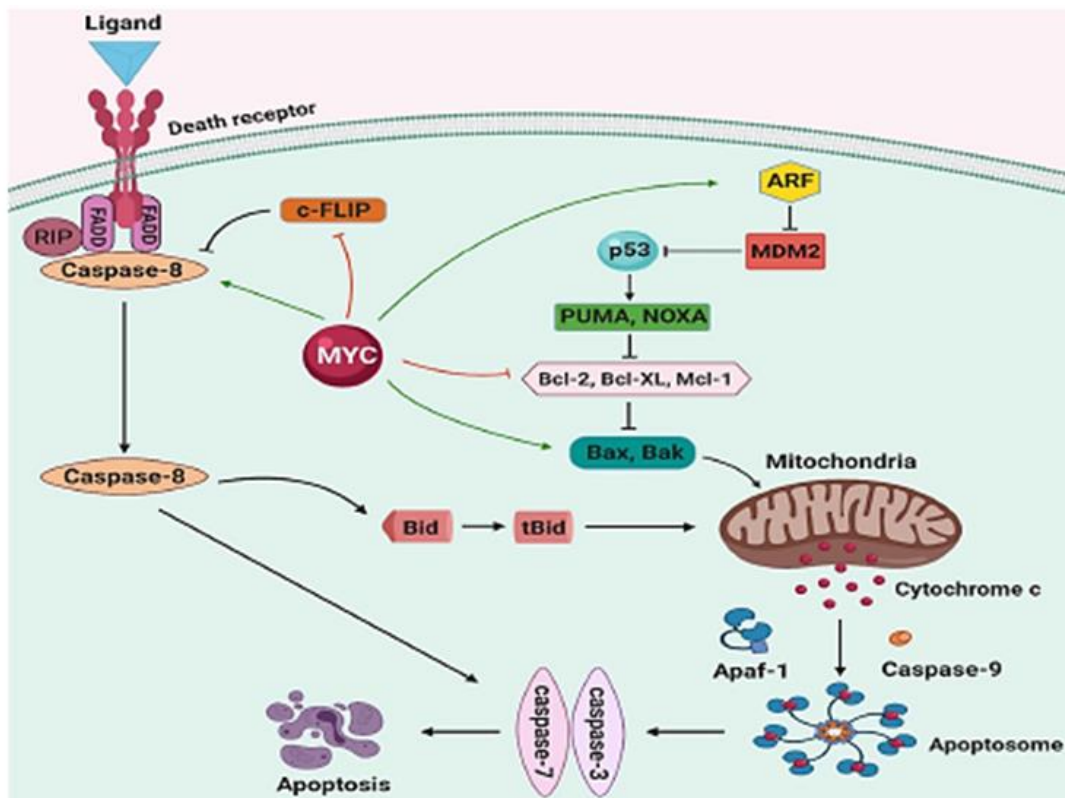


Figure 10: Signalisations apoptotiques régulées par c-Myc.

c-Myc sensibilise les cellules à un large éventail de signaux apoptotiques. La première voie apoptotique décrite est dépendante de p53, où c-Myc stabilise p53 par la voie ARF (ADP-Ribosylation Factor)/MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog). La seconde voie décrite est indépendante de p53, c'est-à-dire via la voie mitochondriale. c-Myc induit l'expression de Puma (p53 Upregulated modulator of apoptosis, BH3-only factor) directement (non montré) ou par l'intermédiaire de p53. Puma inhiberait ensuite Bcl-2 ou Bcl-X_L, ce qui pourrait activer Bax et Bak, entraînant le dysfonctionnement mitochondrial et la libération de cytochrome c. La voie apoptotique extrinsèque est induite à la suite de la ligature des récepteurs de la mort avec leurs ligands (comme FasL/Fas) qui déclenche l'association de la protéine adaptatrice intracellulaire FADD (FAS-associated death domain). Ainsi, FADD recrute la procaspase 8, qui transmet une cascade de signaux en aval, entraînant la libération de cytochrome c et, finalement, l'apoptose. C-Myc régule cette voie en réprimant l'expression du régulateur c-FLIP (Ahmadi et al. 2021).



4.6. Apoptose et c-Myc

Comme nous l'avons abordé dans le paragraphe sur la prolifération cellulaire, outre le rôle de c-Myc dans l'induction de la prolifération et la différenciation, l'expression constitutive et la surexpression protéique de c-Myc sensibilisent les cellules à l'apoptose (Askew et al. 1991) (Evan et al. 1992). Cette induction paradoxale est contrôlée par des signaux et des voies de signalisation qui favorisent soit la croissance soit la mort cellulaire. Ce processus d'apoptose est un mécanisme de secours qui empêche l'émergence de cancers. Il existe diverses voies apoptotiques : la voie dépendante ou non de la p53 (Amanullah, Liebermann, and Hoffman 2000) (Pesse et al. 2014), la voie mitochondriale (Juin et al. 1999), et la voie des récepteurs de mort (CD95...) (Hueber et al. 1997) (Hoffman and Liebermann 2008) (Figure 10).

La surexpression de c-Myc dans des cellules myéloïdes murines dépendantes de l'interleukine 3 (IL 3) induit rapidement leur apoptose suite à la privation en IL3. Cette réponse apoptotique est associée à l'expression constitutive de l'ornithine décarboxylase (ODC) une enzyme clé dans la biosynthèse de polyamines (Askew et al. 1991) (Packham and Cleveland 1994). Les mêmes événements ont été observés pour la lignée cellulaire de fibroblastes Rat-1 et les fibroblastes primaires d'embryons de rat privés de sérum (Evan et al. 1992). Cependant, l'enrichissement du milieu en IL-3 ne permet pas d'empêcher l'apoptose des cellules myéloïdes surexprimant c-Myc, contrairement aux cellules contrôles exprimant faiblement c-Myc qui maintiennent leur viabilité (Askew, Ihle, and Cleveland 1993). Ces études ont montré que l'ODC, en étant une cible directe de c-Myc, était aussi le médiateur de l'apoptose induite par c-Myc. L'augmentation de l'activité de cette enzyme détermine une augmentation de la synthèse de polyamines cellulaires ; l'excès de ces polyamines provoque leur catabolisme par des polyamine oxydases cellulaires à l'origine de la production de ROS, initiateurs d'apoptose (Bello-Fernandez, Packham, and Cleveland 1993) (Packham and Cleveland 1994).

Une partie des effets apoptotiques de c-Myc est dépendante de l'activation en aval de p53, plus précisément de l'axe Arf-MDM2-p53. *ARF* (ADP-Ribosylation Factor) est un gène suppresseur de tumeurs dont le produit (p19Arf chez la souris et p14ARF chez l'homme) antagonise l'activité ubiquitine E3 ligase du régulateur négatif de p53, MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog). c-Myc induit l'expression d'*ARF*, par la voie de signalisation de FOXO avec pour conséquence l'activation de p53 (Zindy et al. 1998) (Bouchard et al. 2007). Il s'en suit une réponse transcriptionnelle dépendante de p53 qui aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Figure 10) (Ahmadi et al. 2021).



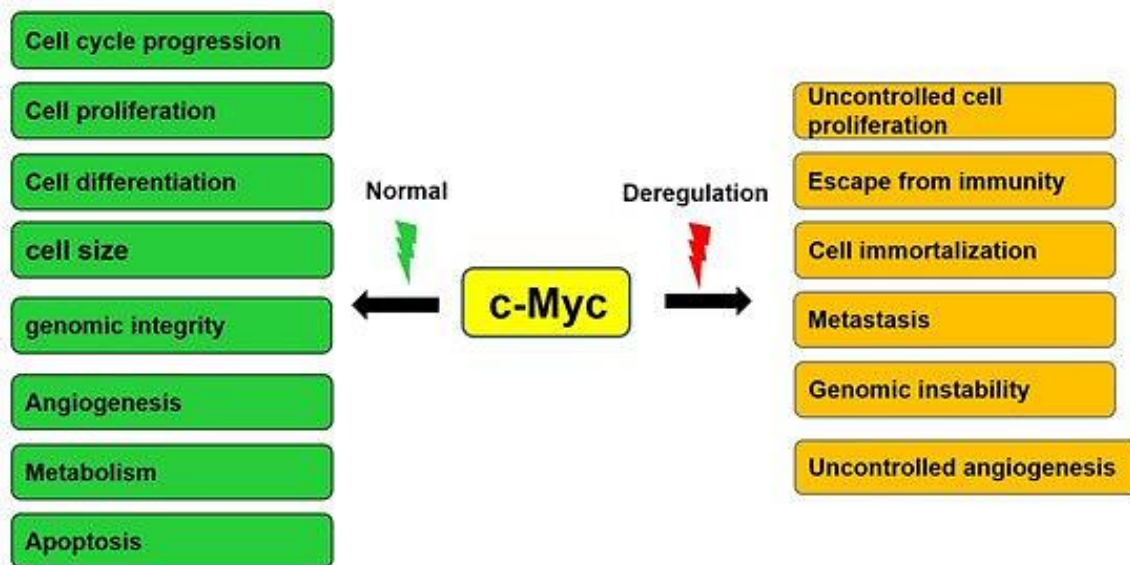


Figure 11: Mécanismes cellulaires contrôlés par c-Myc dans des conditions normales et lors de la tumorigénèse.

c-Myc est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la prolifération et le métabolisme cellulaires, l'apoptose, la différenciation, l'angiogénèse, mais aussi l'instabilité génomique. Sa dérégulation (surexpression) peut aboutir, par l'exacerbation de ces régulations et des effets oncogéniques, à la transformation cellulaire et au développement tumoral (Elbadawy et al. 2019).



D'autres études ont montré l'existence de mécanismes apoptotiques indépendants de p53. En effet l'apoptose induite par des niveaux élevés de c-Myc peut s'observer en l'absence de p53 (Fairlie and Lee 2021). Plus précisément, ces mécanismes mettent en jeu la voie mitochondriale de l'apoptose en augmentant l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bim) (Soucie et al. 2001) (Egle et al. 2004) (Nieminen et al. 2013) ou en réprimant les protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xl) (Eischen et al. 2001). L'importance de la phase mitochondriale dans le processus apoptotique induit par c-Myc est démontrée par le fait que, dans un milieu dépourvu en sérum, la surexpression de Bcl2 est capable de bloquer l'apoptose induite par c-Myc et est responsable de la chimiorésistance des cellules cancéreuses dont le gène *c-MYC* est activé (Bissonnette et al. 1992). c-Myc participe par conséquent également à la libération du cytochrome c mitochondrial conduisant à l'activation des caspases effectrices (Juin et al. 1999) (Iaccarino et al. 2003) (Ahmadi et al. 2021).

Enfin la réponse apoptotique induite par c-Myc met en jeu finalement la voie des récepteurs de mort. Plus précisément, c-Myc sensibilise les cellules à l'apoptose induite par la signalisation des récepteurs de mort tels CD95/Fas (Hueber et al. 1997) et TRAIL-R (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand Receptor). En effet, c-FLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)), un acteur anti-apoptotique est réprimé par c-Myc ; c-FLIP se lie à la protéine adaptatrice FADD (FAS-associated death domain protein) ce qui empêche l'activation des caspases 8 et 10 au niveau des récepteurs de mort. Ainsi, en réprimant l'expression de c-FLIP, c-Myc aboutit à une sensibilisation de la voie TRAIL/TRAIL-R et une boucle d'amplification de la caspase 8 (Ricci et al. 2004) (Nieminen et al. 2007) (Ahmadi et al. 2021).

II. Régulation de l'expression de c-Myc

Comme nous venons de le voir, c-Myc est un facteur de transcription pléiotrope et un puissant oncogène, qui joue un rôle pivot dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire et même l'apoptose (Elbadawy et al. 2019) (Figure 11). Par conséquent la cellule doit pouvoir contrôler en permanence son expression et il n'est pas étonnant que même de légères modifications de la quantité de cette oncoprotéine contribuent au développement de la majorité des néoplasmes, en particulier le lymphome de Burkitt (BL) (Gerbitz et al. 1999). *c-MYC* fait partie des gènes « immediate early genes » qui ne sont pas transcrits dans les cellules quiescentes, mais dont la synthèse est très rapidement induite en réponse à la signalisation d'un récepteur de facteur de croissance. Dans les cellules normales, c-Myc est donc étroitement



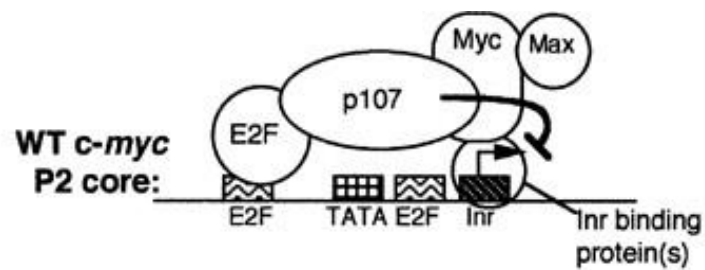


Figure 12: Représentation de mécanisme d'auto-répression du promoteur P2 de c-Myc.

L'auto-répression de c-Myc nécessite la fixation d'hétérodimères c-Myc/MAX à l'Inr, la liaison d'E2F au site E2F ainsi que l'interaction de p107 à la fois avec c-Myc et E2F (Luo et al. 2004).



contrôlé à plusieurs étapes (transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle) et ces mécanismes peuvent être perturbés dans les cellules cancéreuses. Lors de la prolifération cellulaire, la transcription du gène *c-MYC* est normalement stimulée par les mitogènes et contrôlée au niveau de l'initiation et l'élongation (C. A. Spencer et al. 1990). De plus, la demi-vie de l'ARN/la protéine c-Myc est de 30 min et 20 min respectivement dans une cellule normale non-transformée après avoir reçu les signaux de croissance cellulaire (Rabbitts et al. 1985) (Herrick and Ross 1994). Ainsi, le niveau de c-Myc détermine le devenir cellulaire (prolifération, apoptose, différenciation, ...) et sa dérégulation peut mener au processus tumoral (Figure 11).

1. Régulation transcriptionnelle de *c-MYC*

Il s'agit d'un processus complexe qui se réalise à différents niveaux : épigénétique, transcriptionnel, comme au niveau de la traduction et de l'élongation.

1.1. Autorégulation de *c-MYC*

La protéine c-Myc est capable de réprimer son propre promoteur d'une manière dépendante de sa concentration au niveau de l'initiation de la transcription (Penn et al. 1990). Cette autorégulation négative nécessite la formation d'hétérodimères c-Myc/MAX (Facchini et al. 1997). En revanche, ces hétérodimères c-Myc/MAX ne se fixent pas au site de liaison (E-Box) car le promoteur de *c-MYC* n'en contient pas. Le promoteur P2 est principalement le promoteur le plus réprimé par un mécanisme impliquant les éléments initiateurs Inr (Initiator Element) et le site de liaison à E2F (Facteur de liaison du promoteur E2). Le promoteur P1 peut être aussi réprimé au niveau de l'initiation (Lucas, Wilkie, and Lang 1993) (Albert et al. 2001). La mutation ou la perte de p107 (protéine similaire à la protéine du rétinoblastome pRb) abolit l'auto-répression de c-Myc, ce qui montre que p107 est essentielle à l'autorégulation de c-Myc. Pour réprimer le promoteur P2, p107 doit se lier à la fois à c-Myc et E2F (Figure 12) (Luo et al. 2004). Cette boucle d'autorégulation de c-Myc est un mécanisme crucial protecteur de la transformation cellulaire due à l'activité oncogénique de c-Myc. La perte de cette autosuppression est observée dans plusieurs lignées cancéreuses (Bennett, Evan, and Newby 1994) (Wierstra and Alves 2008a).



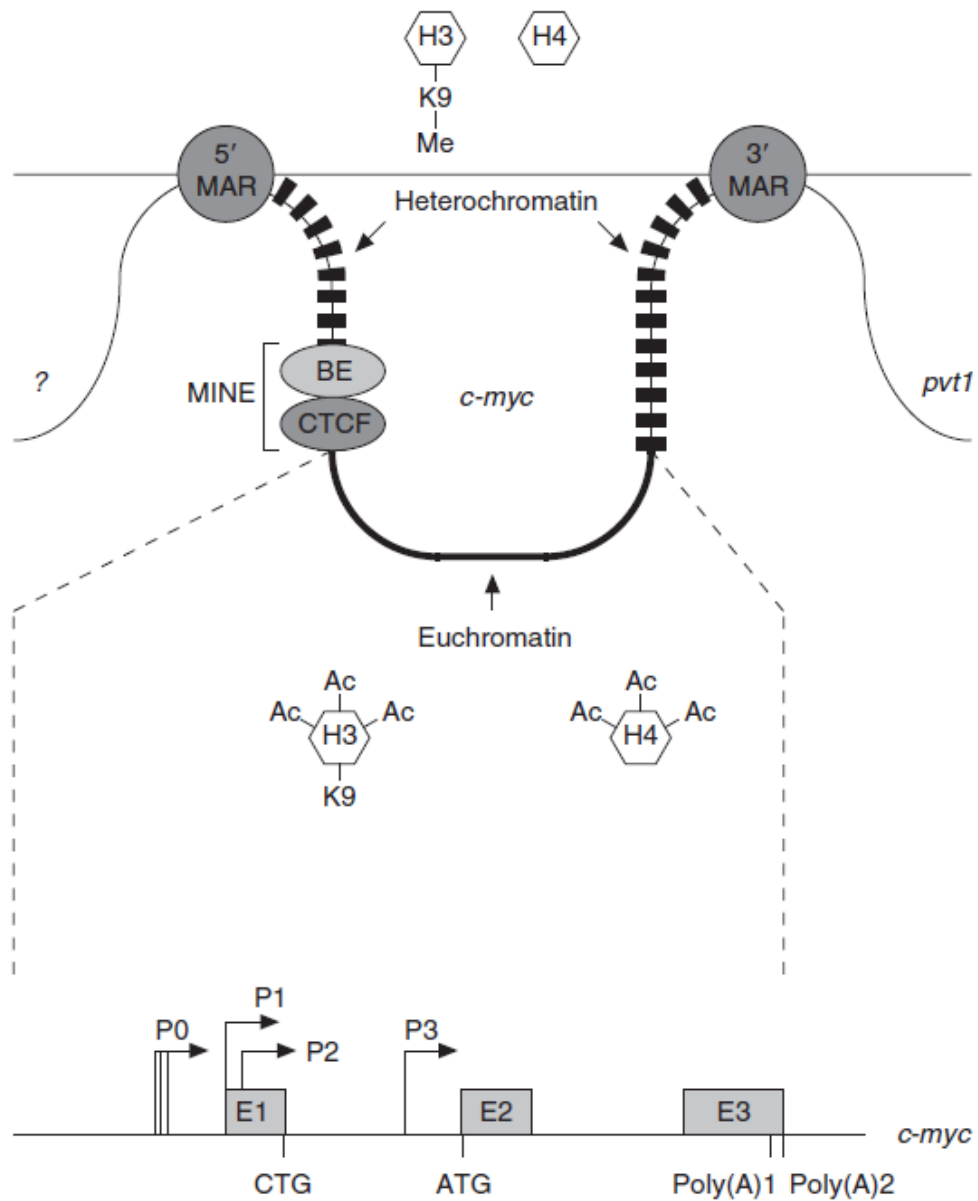


Figure 13: Représentation schématique du locus et de la structure du gène *c-MYC* humain.

L'encadrement du locus *c-MYC* par deux régions d'ADN appelées MAR (Matrix Attachment Region) permet à la fois son isolement des gènes voisins et sa régulation. Le promoteur et les régions transcrites de *c-MYC* sont de l'euchromatine avec des histones H3 et H4 hyperacétylées (actifs sur le plan transcriptionnel). Des deux côtés de l'euchromatine, l'ADN est hétérochromatine (histones hypoacétylées). MINE (*c-MYC* inhibitor element) est un isolateur formé d'un élément barrière (BE) et d'un site de liaison de CTCF (Répresseur de la transcription) (Wierstra and Alves 2008).



1.2. Effet de la structure de la chromatine au niveau du locus *c-MYC*

La structure du gène *c-MYC* permet sa régulation (Figure 13). En effet, le locus *MYC* est encadré par deux régions dites MAR (Matrix Attachment Regions) qui sont des séquences d'ADN permettant l'ancrage de la chromatine à la matrice nucléaire, séparant ainsi le gène *MYC* des gènes voisins. Les MARs sont localisés à 50 kb en 5' et 80 kb en 3' du locus de *c-MYC*, et forment une boucle. Cette boucle permet de décompacter l'ADN facilitant ainsi l'association des régions promotrices avec des facteurs de transcription. Les régions promotrice et transcrite de *c-MYC* sont localisées dans une région d'euchromatine, transcriptionnellement active, caractérisée par une hyperacétylation des histones H3 et H4 et la non-méthylation de la lysine K9 de l'histone H3. L'euchromatine est bornée par l'hétérochromatine transcriptionnellement inerte, renfermant des histones H3 et H4 hypoacétylées et la méthylation de K9 de l'histone H3 (Gombert et al. 2004). Dans la région située à 2.5 kb en 5' en amont du site d'initiation de la transcription de *c-MYC* un insulateur *MINE* (Myc Insulator Element) sépare l'euchromatine et l'hétérochromatine. Cet isolant est composé d'un élément de barrière (BE, Barrier Element) et d'un site de liaison au répresseur transcriptionnel CTCF (CCCTC-binding Factor) occupé par le facteur CTCF. Ce dernier agit alors comme un répresseur de la transcription du gène *c-MYC* en bloquant les séquences amplificatrices (enhancers) et le recrutement de HDAC (Histone Deacetylase) (Filippova et al. 1996) (Mansour et al. 2016). Ainsi, la délétion de CTCF régule à la hausse *c-Myc* (Qi et al. 2003).

1.3. Influence du statut de méthylation du locus *c-MYC*

D'une façon générale, le degré de méthylation du gène *c-MYC* influence aussi son expression. Une hypométhylation de l'exon 3 de *c-MYC* est impliquée dans le développement des tumeurs malignes de cellules B (Crossen and Morrison 1999) ainsi qu'une surexpression de *c-Myc* dans les cellules de myélome (Ohtsuki et al. 1991), cancers hépatiques (Tsujiuchi et al. 1999) et cancers gastriques (Sharrard et al. 1992). Une étude récente montre que le cucurbitacine B, un composé organique extrait de *Trichosanthes cucumerina*, diminue la prolifération des cellules cancéreuses du sein suite à la régulation à la hausse de DNMT1 (DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 1) et ainsi une forte méthylation des promoteurs de *c-MYC* (Dittharot et al. 2019). Une étude portant sur le statut de méthylation du locus *MYC* (exon 3) chez 50 patients caucasiens atteints de cancer de la prostate et 50 afro-américains, a révélé une hyperméthylation



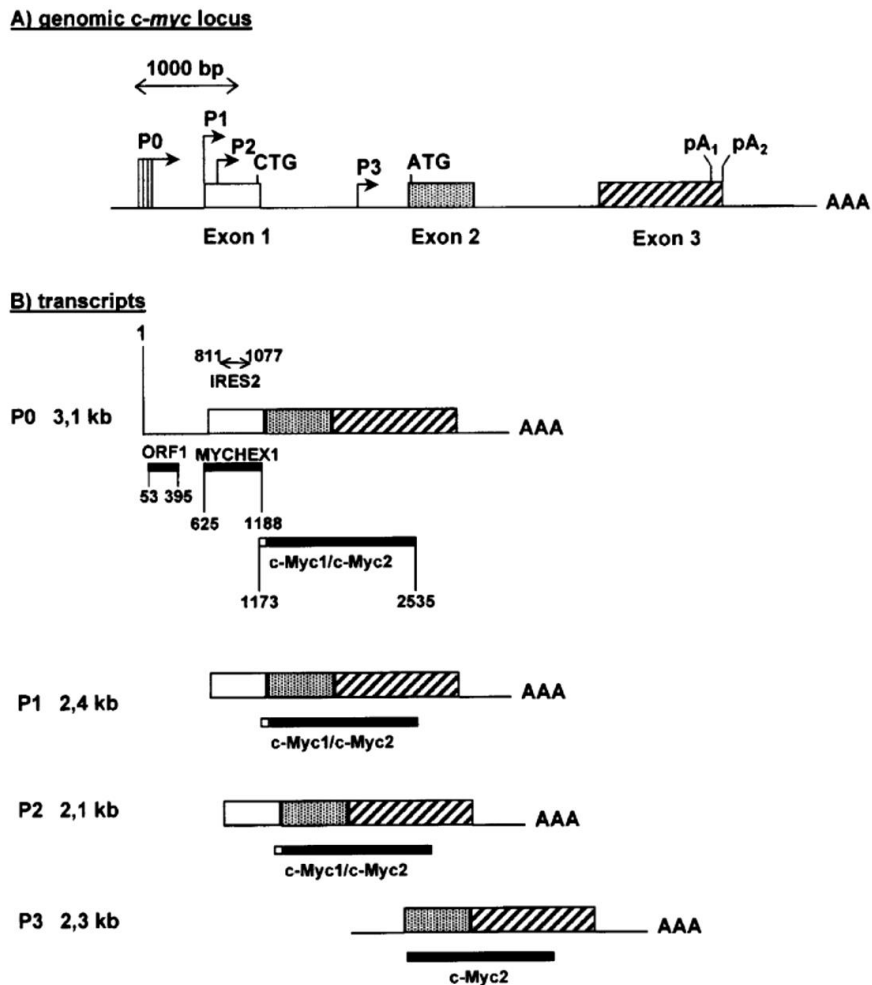


Figure 14: Représentation de la structure du gène c-MYC et des différents transcrits.

(A). Les exons sont représentés par les boîtes ouvertes et hachurées, les promoteurs sont indiqués par les flèches courbées, les deux codons initiateurs majeurs (CTG et ATG), ainsi que les deux sites de polyadénylation (pA1 et pA2). (B). Les transcrits résultants de chaque promoteur (montrés à gauche). Le transcrit P0 contient 3 cadres de lecture : l'ORF 5' (ORF1) code pour une protéine de 114 aa, l'ORF du milieu code pour une protéine de 188 aa (les deux protéines sont différentes de c-Myc 1 et c-Myc 2), le troisième cadre code pour les deux protéines c-Myc1 et c-Myc2. Les transcrits de P1 et P2 codent pour c-Myc1 et c-Myc2. Alors que le transcrit de P3 ne code que pour c-Myc2. IRES (ici nommé IRES2) est une structure de l'ARNm qui permet une traduction indépendante de la coiffe. IRES: Internal Ribosome Entry Site, ORF: Open Reading Frame (Nanbru et al. 2001).

de six sites CpG de l'exon 3 de *c-MYC* dans les tissus sains par rapport aux échantillons de tumeurs des mêmes patients (Barry et al. 2020).

1.4. Régulation transcriptionnelle de *c-MYC*

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'oncogène *c-MYC*, *c-MYC* possède 4 promoteurs P0, P1, P2 et P3, avec dans les cellules normales un rôle majoritaire de P2 et à un degré moindre de P1. L'existence de ces 2 promoteurs offre la possibilité de leur régulation indépendante et différente mais aussi la possibilité de liens intimes dans leur régulation. Les transcrits formés à partir de P1 et P2 génèrent 2 protéines désignées par c-Myc1 et c-Myc2 sur lesquelles nous reviendrons plus loin (Stephen R. Hann et al. 1988). Dans un certain nombre d'ARNm qui codent pour d'importantes protéines de régulation, comme c-Myc, la traduction peut être initiée à partir de codons non-AUG situés en amont, en plus généralement d'un AUG en aval et dans le cadre de lecture. La protéine présentant cette région N-terminale modifiée a une fonction et une distribution cellulaire altérées. Ainsi un codon d'initiation CUG a été identifié dans l'ARNm de *c-MYC* à la fin de l'exon 1 (Figure 14).

De plus, comme nous allons le détailler ensuite, la régulation transcriptionnelle de *c-MYC* se situe au niveau de la traduction mais aussi de l'élongation. Ainsi c'est un processus complexe car il existe des connexions étroites entre l'initiation et l'élongation des transcrits P1, P2 et du ratio P1/P2. De plus, les facteurs de transcription et voies de signalisations qui régulent positivement ou négativement les promoteurs de *c-MYC* peuvent agir simultanément ou de façon séquentielle au cours de l'assemblage ou la progression du complexe de pré-initiation ; cela influence finalement le décrochage (promoter escape) ou le maintien des complexes d'initiation avec la Pol II en pause. Enfin l'importance de la régulation de P1 par rapport à P2 varie en fonction des tissus et des types cellulaires.

1.4.1. Choix du promoteur

Le proto-oncogène *c-MYC* est transcrit, comme nous l'avons signalé précédemment, à partir de quatre promoteurs alternatifs (P0, P1, P2, P3). P0 est situé dans la région 5'UTR de *c-MYC* en amont de l'exon 1. Les promoteurs P1 et P2 sont séparés par 150 pb et localisés dans l'extrémité 5' de l'exon 1. Les multiples points de départ de la transcription présents dans le gène permettent la formation de quatre transcrits différents P0, P1, P2 et P3 ARNm de 3,1 kb, 2,4 kb, 2,1 kb et 2,3 kb, respectivement (Figure 14). La traduction des transcrits P0, P1 et P2 peut



démarrer à partir de 2 différents codons d'initiation (CUG ou AUG) aboutissant à la synthèse de 2 protéines (c-Myc1 et c-Myc2) (Stephen R. Hann et al. 1988). Des formes plus courtes de la protéine c-Myc (c-MycS) ont été ensuite décrites dans différentes lignées cellulaires et ont été caractérisées comme des formes tronquées de c-Myc2 comme nous le décrirons dans la partie « traduction » (Spotts et al. 1997).

Par contre les transcrits P3 codent uniquement pour la protéine c-Myc2 (D. Ray and Robert-Lézénès 1989). Il est à noter que contrairement aux autres promoteurs, le promoteur P0 conduit l'expression du transcrit tricistronique *c-MYC* P0 mRNA comprenant 3 cadres ouverts de lecture (ORFs, Open Reading Frame), et seul l'ORF3 (situé en 3') conduit à la synthèse de c-Myc1 et c-Myc2 (Bentley and Groudine 1986) (Nanbru et al. 2001) (Figure 14). Ainsi, le choix du promoteur peut avoir un impact sur la régulation de la transcription de c-Myc. Dans les cellules normales, les transcrits proviennent principalement du P2. Le rapport d'utilisation des sites d'initiation de la transcription P1: P2 varie entre 1:10 et 1:5 dans les cellules normales proliférantes bien que P1 et P2 aient la même demi-vie ; il passe à 1:1 et plus de 4 :1 dans les cellules anormales (Wierstra and Alves 2008). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, un exemple bien caractérisé de dérégulation de *c-MYC* est représenté par les lymphomes de Burkitt, avec un « shift » de l'usage du promoteur P2 vers P1 qui coïncide avec une perte du blocage de l'élongation transcriptionnelle.

En général la transcription à partir de P2 est surtout régulée au niveau de l'élongation (Wierstra and Alves 2008). L'activité de P2 dépend de centaines d'amplificateurs tissu spécifiques, et de séquences régulatrices proximales au promoteur: la boîte TATA, le site CT-I₂ (ou ME1a1 chez la souris) ou en position -40 pb, le site de liaison d'E2F en position -58 pb, et la région FUSE (*Far Upstream Element*), situé à -1500 pb par rapport au site de transcription de P2 impliquée dans la conformation et la topologie de l'ADN.

L'élément CT-I₂ (ou CT-element) localisé entre P1 et P2 est essentiel pour le blocage de l'élongation transcriptionnelle. De plus, il est essentiel à la transcription à partir de P2 mais fonctionne comme un élément négatif à celle à partir de P1. Enfin, CT-I₂ est aussi nécessaire au maintien d'une configuration ouverte de la chromatine au niveau des promoteurs P1 et P2 (Wright et al. 1991) (DesJardins and Hay 1993) (Albert et al. 2001).

L'activité transcriptionnelle de P2 est aussi influencée par des processus de remodelage de la chromatine et des super enroulements de l'ADN. Dans les cellules non proliférantes, FUSE, un élément riche en AT, est masqué par un nucléosome et il existe un complexe d'échappement



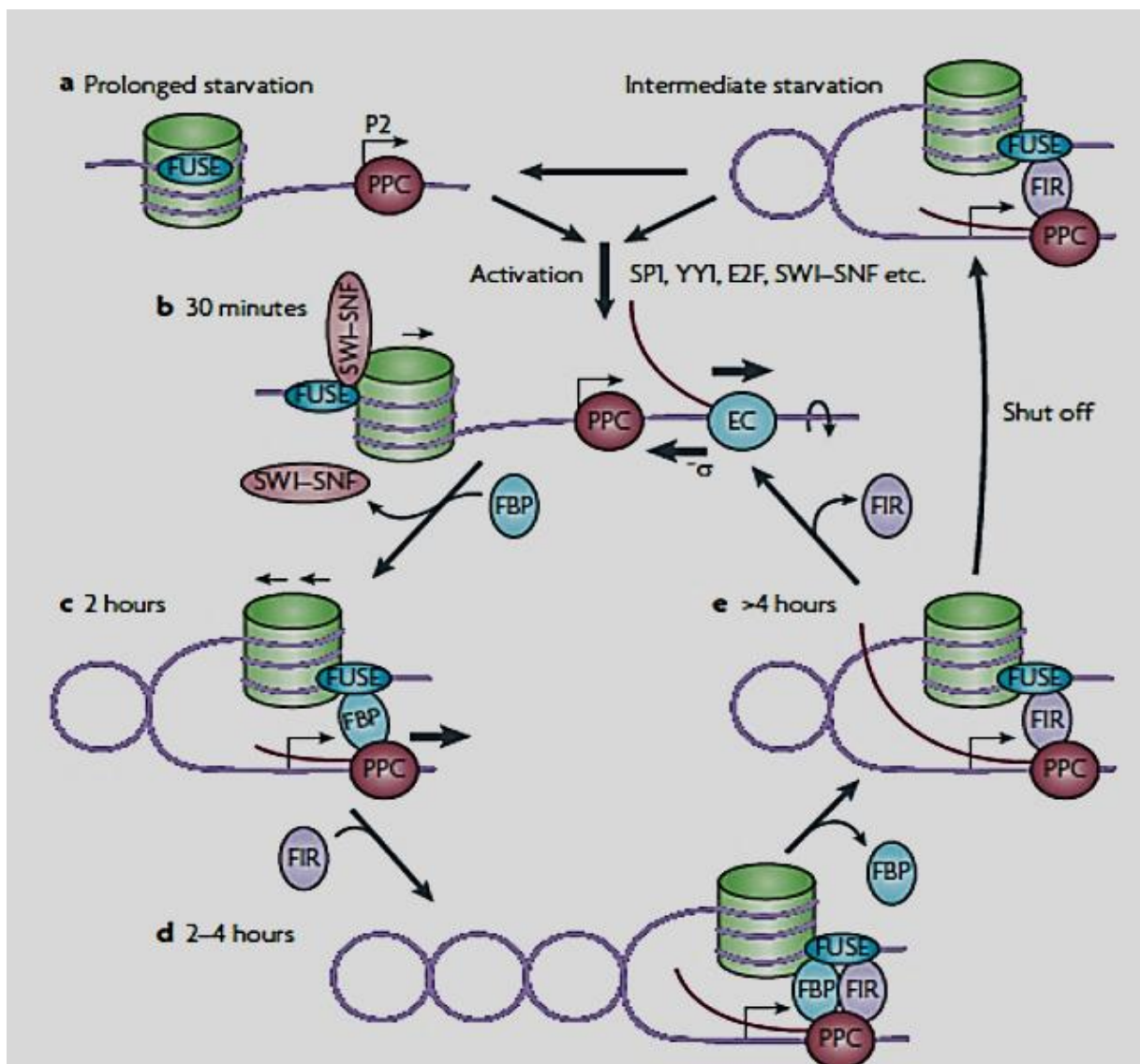


Figure 15: Mécanismes de régulation transcriptionnelle de c-MYC par le superenroulement de l'ADN

En l'absence de sérum, la transcription de c-MYC est inhibée et l'élément FUSE situé en amont de c-MYC est masqué par le nucléosome. Le complexe PPC est mis en pause dans la région proximale du promoteur P2. Suite aux signaux d'activation, un changement de la structure de l'ADN est accompagné par l'activité SWI/SNF, une sous-famille de complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP. Le PPC se transforme en un complexe d'élongation et provoque un remodelage de la chromatine, qui démasque FUSE. Par la suite, FBP se lie à l'élément FUSE et régule l'activation transcriptionnelle subséquente de c-MYC. Le recrutement de FIR par FUSE retarde le cycle de transcription. FUSE : Far Upstream Element, FBP : FUSE binding protein, FIR :FBP interacting repressor, PPC: Pre-Promoter escape Complex, SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable (Brooks and Hurley 2009).



du pré-promoteur (*PPC*, *pre-promoter escape complex*) en pause sur le site de début de transcription P2. Le proto-oncogène *c-MYC* est donc silencieux. Lors de l'activation, qui peut être déclenchée par de nombreux facteurs agissant simultanément et/ou séquentiellement, la vitesse d'échappement de la polymérase en pause est augmentée, ce qui entraîne une reprise de la transcription (Chung et al. 2006). L'événement stimulant transforme le PPC en un complexe d'élongation et provoque un remodelage de la chromatine, qui démasque le facteur FUSE. La transcription qui en résulte crée un super enroulement en amont de *c-MYC* qui permet le recrutement par FUSE de l'activateur transcriptionnel FBP (Fuse Binding Protein). Le facteur FBP entre en contact avec le TFIID (qui possède une activité hélicase) au niveau du promoteur de *c-MYC* et stimule la transcription pour créer un pic d'expression. Cette régulation positive de *c-MYC* est au moins en partie contrecarrée par FIR (FBP interacting repressor) qui se lie à FBP et FUSE et s'oppose à l'activité hélicase de TFIID, retardant ainsi le cycle de transcription (J. E. A. Lee et al. 2014) (Brooks and Hurley 2009) (Figure 15).

1.4.2. Voies de signalisation et facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation des promoteurs de *c-MYC*

L'activité des promoteurs de *c-MYC* est contrôlée par de très nombreuses voies de signalisation (Chanvorachote, Sriratanasak, and Nonpanya 2020) (Figure 16):

- Cytokines (IL-1, IL-6 : Interleukin1/6 ; INF- γ : Interferon gamma; TNF : Tumor Necrosis Factor ; TGF- β : Transforming growth factor beta)
- Facteurs de croissance (PDGF: Platelet derived growth factor; EGF: Epidermal growth factor)
- Hormones (oestrogènes, hormones thyroïdiennes, EPO: erythropoietin)

L'expression de *c-Myc* peut-être régulée positivement par les voies de signalisation de nombreux ligands de récepteurs cellulaires comme Notch, WNT, Hedgehog, des cytokines (voie JAK (Janus kinase) –STAT) qui activent des facteurs de transcription capables de se fixer sur le promoteur de *c-MYC* pour régler l'expression et la stabilité de *c-Myc*. Il est à noter une forte redondance dans cette régulation du promoteur de *c-MYC* à l'exemple du PDGF qui régule ce promoteur en activant différents facteurs de transcription capables de se fixer sur ce promoteur (Figure 16) ; de même des facteurs qui exercent une action prédominante sur la transcription de *c-MYC* dans un cas de situation biologique peuvent devenir faibles voir impuissants dans d'autres circonstances. Finalement les mêmes facteurs qui régulent positivement la transcription de *c-MYC* dans certaines circonstances ou types cellulaires



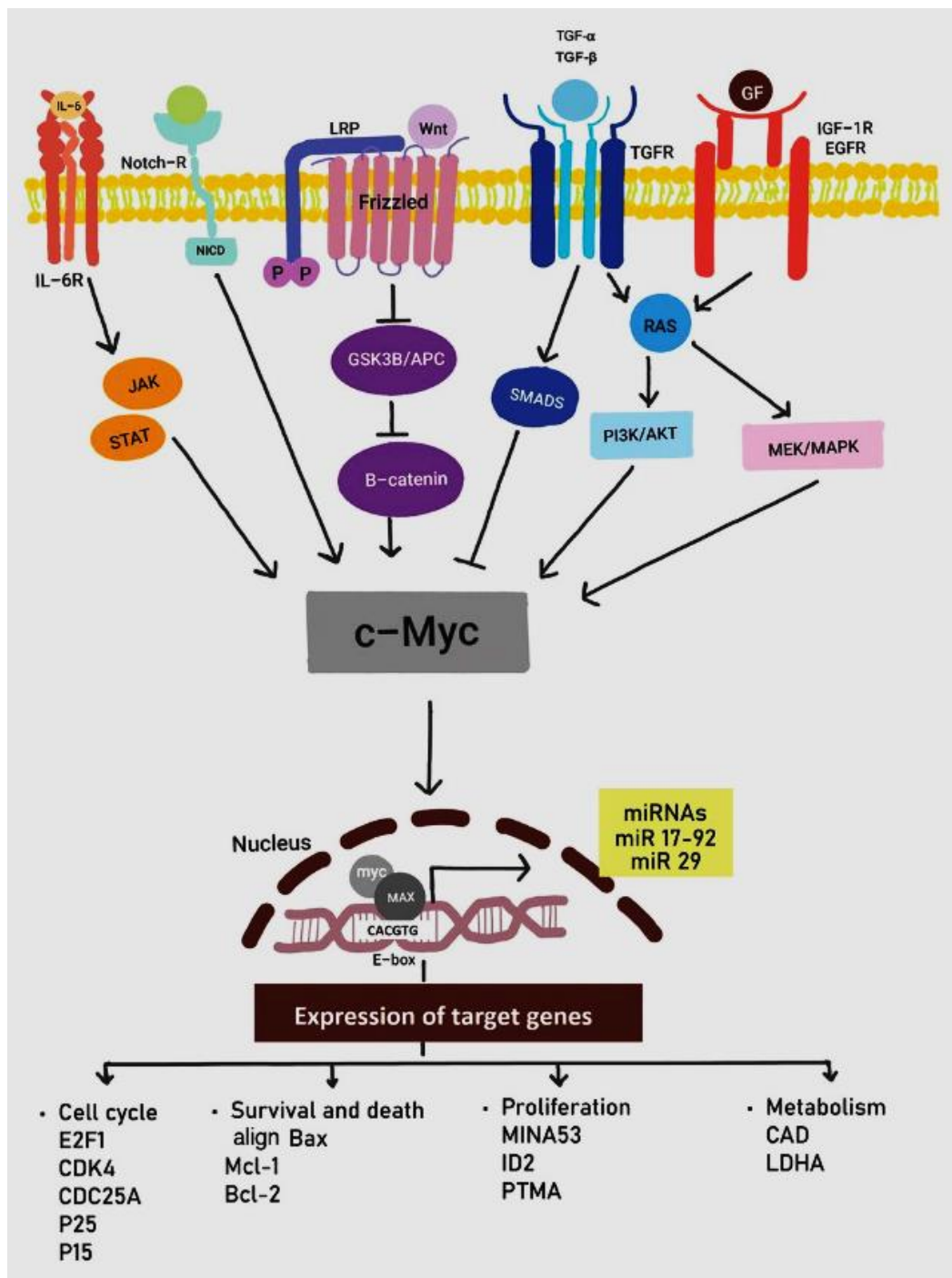


Figure 16: Principales voies de signalisation régulant la transcription de *c-MYC*.

Les voies JAK/STAT, signalisations Wnt/ β catenin, et Notch et voies Ras/PI3K/AKT/GSK-3 peuvent réguler *c-MYC*, ce qui entraîne une augmentation de niveau de *c-Myc*. Par la suite, les niveaux élevés de *c-Myc* contrôlent l'expression de nombreux gènes qui affectent de nombreuses activités cellulaires telles que la progression du cycle cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la survie et la mort (Chanvorachote, Sriratanasak, and Nonpanya 2020).



peuvent la réguler négativement dans d'autres situations (ex NF- κ B) (pour revue (Wierstra and Alves 2008)).

D'autres signalisations ou facteurs de transcription répriment le promoteur *c-MYC* tels que TGF- β (via Smad5), C/EBP α (CCCAT/Enhancer Binding Protein alpha), Blimp1 (B lymphocyte induced maturation protein-1) et p53 induisant ainsi l'apoptose des cellules (Y. Lin, Wong, and Calame 1997) (Figure 16).

Beaucoup de facteurs de transcription, particulièrement importants pour la régulation du promoteur de *c-MYC*, sont ciblés par de multiples voies de signalisation et par conséquent régulent la transcription de *c-MYC* en réponse à des signaux prolifératifs ou anti-prolifératifs. On peut citer par exemple les facteurs E2F, β -catenin/TCF4, FBP (Fuse Binding Protein), Smad3, NF- κ B et STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3). A noter le rôle aussi des régulations épigénétiques sur ces régulations ; ainsi la méthylation des sites CpG, qui se trouvent dans la région promotrice de *c-MYC* inhibe la fixation des facteurs de transcription E2F (Campanero, Armstrong, and Flemington 2000).

Finalement et comme évoqué précédemment, d'autres facteurs de transcription comme ceux la famille NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) présentent à la fois une activité régulatrice positive et négative. Le gène *c-MYC* possède deux sites de liaison à NF- κ B : URE (Upstream Regulatory Element) localisé en amont du promoteur P1 et IRE (Internal Regulatory Element) dans l'exon1. Différentes dimères de sous-unités de NF- κ B peuvent se fixer et réguler *c-MYC*: ainsi, RelB/p52, RelA/p50 et la surexpression de sous-unité RelA activent la transcription de *c-MYC*, alors que p50/p50 et la surexpression de p50 répriment sa transcription (Wierstra and Alves 2008). NF- κ B lui-même peut être stimulé par diverses voies de signalisation telles que par l'IL-1 (Jurida et al. 2015), le TNF (Tumor Necrosis Factor) revu par Hayden et Ghosh (Hayden and Ghosh 2014) ou encore par la cytokine CD40L (Hostager and Bishop 2013).

Il faut noter que certaines voies impliquées dans la régulation de la transcription de *c-MYC* sont aussi retrouvées dans d'autres niveaux de régulation de c-Myc. Ainsi la cascade de kinases Raf-MEK-ERK et la voie phosphatidylinositol-3-OH kinase (PIK3) - AKT qui stabilisent la protéine c-Myc. En effet, le niveau de c-Myc dans la cellule est régulé par 2 voies kinasiques : ERK phosphoryle la Ser62 de c-Myc ce qui la stabilise alors que la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryle c-Myc au niveau de la Thr58, favorisant ainsi l'ubiquitination et la déphosphorylation de la Ser62 suivi de la dégradation de c-Myc par la voie protéasomique (R. Sears et al. 2000) (Kazi et al. 2018). En inhibant par phosphorylation GSK-3 β , l'AKT maintient



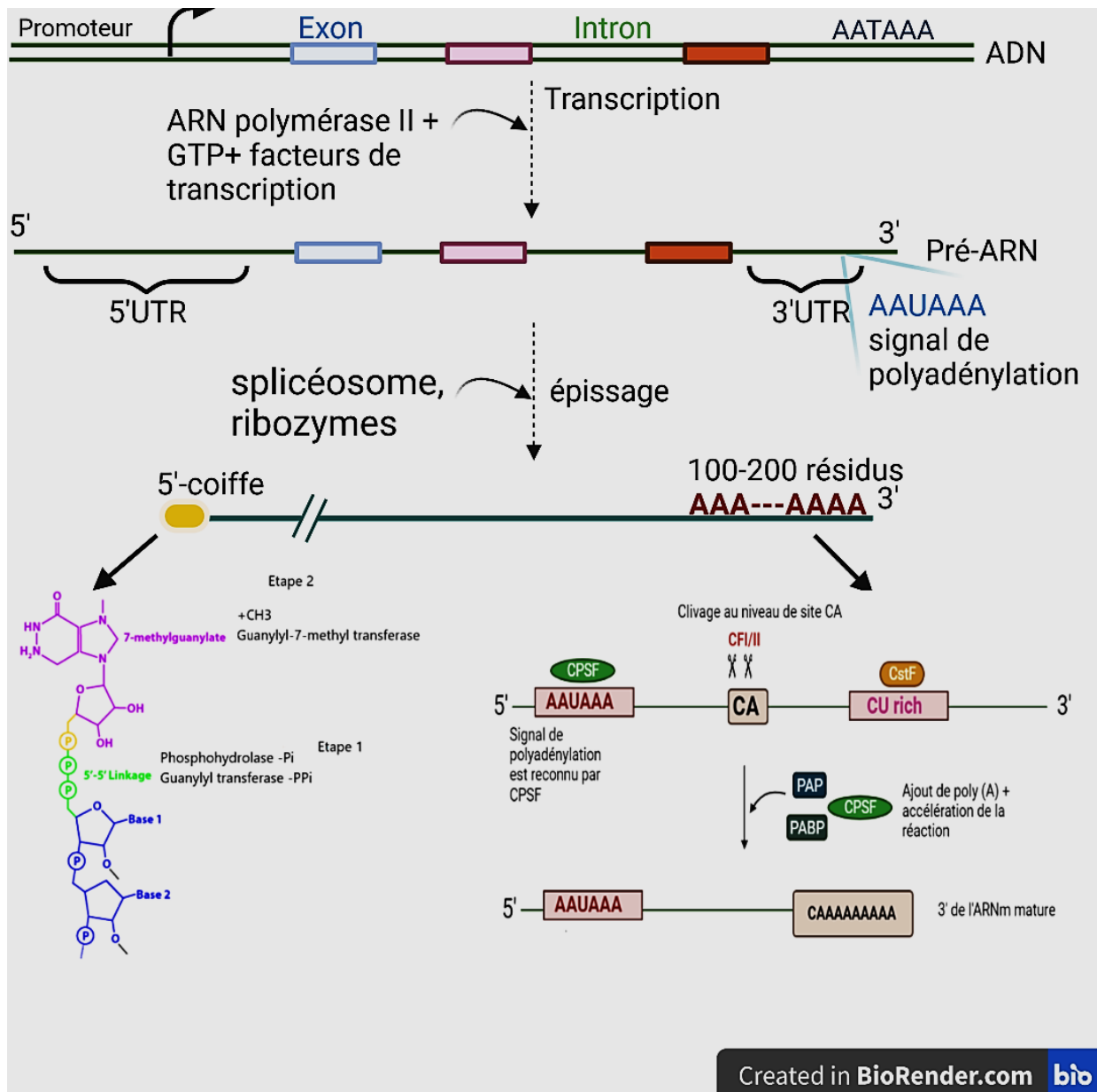


Figure 17: Maturation de l'ARNm chez les eucaryotes.

Le pré-ARNm est synthétisé à partir de l'ADN par transcription qui se produit dans le noyau par des ARN polymérase II et des facteurs de transcription. Le pré-ARNm n'est pas traduit. Il doit subir une transformation importante dans le noyau pour créer un ARNm mature prêt à être exporté dans le cytoplasme. Les trois étapes les plus importantes du pré-ARNm: l'ajout de la coiffe en 5', l'ajout de la queue polyA en 3' et l'épissage. L'ajout de la coiffe de 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' dès qu'il atteint environ 30 nucléotides de long. Cette coiffe protège le messenger de la dégradation et recrute les facteurs d'initiation impliqués dans la traduction. Un complexe protéique contenant une endonucléase se lie au consensus AAUAAA (signal de polyadénylation). L'enzyme poly(A) polymérase (PAP) qui fait partie de ce complexe permet l'ajout immédiatement d'une chaîne d'environ 150-200 nucléotides A à l'extrémité 3' du messenger précurseur. Ceci protège davantage l'ARNm de la dégradation, et participe à la liaison des protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. L'épissage se produit grâce au spliceosome qui reconnaît les séquences à l'extrémité 5' de l'intron (GU) et les séquences à l'extrémité 3' de l'intron (AG). Une liaison covalente lie le G à A et élimine l'intron. Finalement, l'ARNm mature est exporté hors du noyau pour être éventuellement traduit en protéines ou peut être stocké dans des compartiments de la cellule, ou subit une dégradation par des endonucléases.

la phosphorylation de Ser62 et la Thr58 sous sa forme non phosphorylée, et par conséquent la stabilisation d'une forme active de c-Myc (Marampon, Ciccarelli, and Zani 2019)). Au niveau traductionnel, les cascades de signalisation de mTORC1-S6K1 (Csibi et al. 2014), MAPK-FOXO3A (Kress et al. 2011) et MAPK-HNRPK (Notari et al. 2006) régulent la traduction de l'ARNm de *c-MYC*.

Ainsi, la très grande complexité de la régulation des promoteurs de *c-MYC* reflète la complexité des activités biologiques de c-Myc, facteur essentiel mais aussi dangereux du contrôle de la croissance cellulaire.

2. Régulation post-transcriptionnelle de *c-MYC*

Les pré-ARNm sont soumis à des modifications dans le noyau comme la formation de la coiffe, l'épissage et la polyadénylation aboutissant à des ARNm matures (Figure 17).

La formation de la coiffe (« cap ») caractérisée par une structure 7-méthyl-guanylate (m7G) est ajoutée à l'extrémité 5' du premier exon d'une façon co-transcriptionnelle dès qu'il atteint environ 30 nucléotides de long (Gu and Lima 2005). Puis les introns sont épissés par un complexe de ribonucléoprotéiques (le spliceosome, les ribozymes), et les régions codantes sont flanquées de part et d'autre, par des régions non-codantes : 5'-UTR et 3'-UTR. Comme nous allons le voir ensuite pour *c-MYC*, les régions 5'-UTR et 3'-UTR interagissent avec des complexes protéiques jouant un rôle crucial dans la régulation de la traduction et la localisation subcellulaire de l'ARNm. Finalement, les pré-ARNm subissent une polyadénylation c'est-à-dire l'ajout d'une queue poly(A) de 100-250 nucléotides à l'extrémité 3' du dernier exon (Millevoi and Vagner 2010). L'ARNm mature est alors exporté hors du noyau vers le cytoplasme pour être traduit en protéine par les ribosomes (Figure 17).

Dans certains cas, les ARNm sont traduits de suite mais ils peuvent aussi être transportés dans des compartiments de la cellule avant la traduction ou être soumis à une dégradation très régulée dans le cytoplasme. Des interactions entre des protéines se liant aux ARN (RBP, RNA-binding proteins) et des éléments cis-régulateurs des transcrits sont à la base de la plupart des régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes (Otsuka et al. 2019).

2.1. Régulations co-transcriptionnelles : Maturation des pré-ARNm de *c-MYC*

La première étape de la maturation des pré-ARNm consiste en la formation de la coiffe. Dès que l'ARN atteint une longueur de 25-30 nucléotides, la coiffe est ajoutée à son extrémité



5' afin de le protéger de la dégradation (Gu and Lima 2005) (Ramanathan, Robb, and Chan 2016). La formation de cette structure 7mG(5')ppp(5')Np suit les mêmes étapes et mécanismes que ceux décrits précédemment pour le rôle de c-Myc dans ce même processus.

L'épissage des pré-ARNm est une étape obligatoire pour l'assemblage de la très grande majorité des ARN messagers chez les eucaryotes. Il permet d'éliminer les séquences introniques, quand c'est le cas, par deux étapes de trans-estérification.

L'épissage alternatif est le mécanisme qui, par l'inclusion et l'exclusion différentielle de séquences introniques et exoniques, permet d'obtenir, à partir d'un même pré-ARNm, différents ARNm matures qui codent pour plusieurs protéines (Gilbert 1978). Le complexe spliceosome et les séquences cis-régulatrices participent au mécanisme d'épissage et le choix de brassage exonique. Dans les séquences exoniques, la liaison de la protéine SR (Serine-arginine-rich splicing factors) aux ESE (Exonic Splicing Enhancers), des séquences d'ADN formées de six bases, favorisent l'épissage alors que les ESS (Exonic Splicing Silencers) sont capable de l'inhiber. De même, dans les séquences introniques, d'autres séquences peuvent soit favoriser l'épissage, ISE (Intronic Splicing Enhancers), soit le bloquer, ISS (Intronic Splicing Silencers). Le choix des différents sites d'épissage dépend des facteurs protéiques ; ainsi la protéine SR (riche en sérine et arginine) du spliceosome reconnaît ESE et ISE est capable d'augmenter l'épissage, alors que la protéine de famille hnRNP (Heterogeneous nuclear RNP) interfère avec le recrutement spliceosome en se liant aux ESS et ISS (WANG et al. 2015). Ces protéines sont exprimées d'une manière ubiquitaire. D'autres facteurs exceptionnels exprimés dans des tissus spécifiques peuvent intervenir dans la régulation d'épissage pour sélectionner préférentiellement un isoforme d'ARNm et de protéine en fonction du tissu (NOVA, FOX, TIA1, PTB...) (Nilsen and Graveley 2010). Le domaine terminal C (CTD) de l'ARN poly II joue un rôle clé dans l'efficacité d'épissage en immobilisant les exons « néo-synthétisés » facilitant ainsi leur juxtaposition (McCracken et al. 1997) (de Almeida and Carmo-Fonseca 2008) (Moore and Proudfoot 2009). La vitesse de l'élongation influe aussi sur l'épissage de sorte qu'une lente élongation favorise un site faible d'épissage placé en amont d'un site fort d'épissage (de la Mata et al. 2003) (Dujardin et al. 2013). La structure chromatinienne condensée (hétérochromatine) ou décondensée (euchromatine) peut aussi influencer sur la transcription, et par la suite impacter l'élongation et l'épissage en affectant la dynamique de présentation des sites d'épissage et les sites régulateurs de la machinerie d'épissage (Nogués et al. 2002) (Hnilicová and Staněk 2011).



Cet épissage alternatif est donc l'un des mécanismes qui permettent la diversité des transcrits qui codent pour des isoformes protéiques jouant un rôle dans la diversité de protéomes, l'évolution du génome et participant souvent au développement des pathologies tels que l'oncogène *c-MYC* et le gène de dégénérescence rétinienne, *CRB1* (Protein Crumbs homolog 1) (Carter, Jarquin-Pardo, and De Benedetti 1999) (T. A. Ray et al. 2020). Concernant l'ARNm de *c-MYC* une seule publication a décrit l'existence de ce processus dans la variabilité des transcrits (Bodescot and Brison 1996). En effet, à partir d'une librairie d'ADNc correspondant aux ARNm produits à partir des 4 promoteurs dans une lignée cellulaire humaine de carcinome (SW613-S), ils ont découvert un ADNc correspondant à un nouveau transcrit produit par épissage alternatif à l'intérieur de l'intron 1 et codant uniquement pour *c-Myc2* (p64). Ainsi, même si les études sont trop rares pour conclure, l'épissage alternatif ne semble pas être utilisé dans le cas de la variabilité des transcrits, en tous cas pour générer de nouvelles isoformes protéiques.

La dernière étape de maturation du pré-ARNm est l'ajout de la queue poly A sur l'extrémité 3' des ARNm. Cette réaction nécessite l'intervention d'un signal de polyadénylation ainsi que le recrutement d'un complexe protéique. Le signal de polymérisation est formé de trois séquences : une séquence hexanucléotidique souvent conservée AAUAAA ou AUUAAA située 10-30 bases en amont du site de clivage (CA) et d'un motif riche en U ou en G/U situé 20-40 bases en aval de CA (Beaudoing et al. 2000). La machinerie de la polyadénylation est constituée de deux facteurs de clivage, les endonucléases CFI et CFII (Cleavage Factor I/II) qui sont recrutés au site de clivage, de la poly (A) polymérase (PAP) et de deux facteurs qui permettent la reconnaissance des séquences d'ARN : CstF (Cleavage Stimulation Factor), facteur qui reconnaît spécifiquement la région aval riche en GU et participe au clivage, et CPSF (Cleavage / Polyadenylation Specificity Factor), qui reconnaît la séquence du signal de polyadénylation. La partie C-terminale de pré-ARN fait partie aussi de cette machinerie. Une fois le complexe est formé, le pré-ARNm est coupé au niveau du site de clivage CA lâchant les facteurs CstF, CFI/II ce qui initialise l'activité de PAP accompagnée d'une protéine PABP II (Poly(A) Binding Protein II) en accélérant la réaction de polyadénylation et en jouant un rôle dans l'exportation de l'ARNm vers le cytosol (Kühn et al. 2009). A la fin de cette réaction, le complexe formé de PAP-CPSF se dissocie. La longueur maximale de la queue poly (A) est environ 200-300 résidus adénosine (chez l'homme). Seuls les ARN des histones ne seront pas polyadénylés.

L'ARNm mature est exporté hors du noyau vers le cytoplasme pour être traduit en protéine par les ribosomes (la traduction) (Figure 17).



2.2. Régulation post-transcriptionnelles en lien avec la stabilité des ARNm

Lors du stress cellulaire ou au moment de la différenciation notamment, un ensemble de régulations s'exercent sur les transcrits. Ces mécanismes de régulation se regroupent sous la nomination de « régulation post-transcriptionnelle » et vont contrôler la stabilité des ARNm. L'ARNm c-Myc contient deux régions impliquées dans la régulation de sa stabilité au niveau post-transcriptionnel : la première dans la région 3' non-codante (ARE, AU-rich element) et la deuxième se retrouve à l'extrémité 3'-terminale dans la dernière partie de l'exon 3.

2.2.1. La régulation de la partie codante de l'ARNm

L'ARNm de c-Myc contient des séquences cis-régulatrices dans les derniers 249 nucléotides de sa région codante qui code pour une partie du domaine HLH-LZ. Ces séquences sont nommées CRD (Coding Region Determinant of instability). Comme leur nom indique, les éléments cis-régulateurs CRD déstabilisent l'ARNm en créant un site d'attaque des endonucléases. Lorsque le polysome se ralentit pendant la traduction, ces sites sont dévoilés pour les endonucléases qui dégradent l'ARNm. Ainsi, un ARNm dépourvu de CRD est plus stable qu'un ARNm sauvage de c-Myc contenant le CRD. Des protéines de la famille des CRD-BP (CRD- Binding Protein) comme l'IGF2BP-1 (Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1) se lient à ce motif (Weidensdorfer et al. 2009). Cette fixation augmente la stabilité du messager et sa demi-vie, en empêchant la liaison des endonucléases indépendamment de l'effet de l'AU-RE dans la région 3' UTR (Doyle et al. 1998). La synthèse de ces protéines est activée par la voie β -caténine/TCF. D'autres travaux suggèrent que les CRD-BP séquestrent le messager dans des mRNPs cytoplasmiques (messenger RiboNucleoProtein) en association avec d'autres facteurs tels que HNRNPU (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U), YBX1 (Y-Box Binding Protein 1), DHX9 (DEXH-Box Helicase 9) et SYNCRIP (Synaptotagmin Binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein) (Weidensdorfer et al. 2009). Les CRD-BP sont surexprimées dans des nombreuses tumeurs et la plupart des lignées cellulaires. Il a été montré que l'hétérodimère c-Myc/Max se fixe sur le promoteur de CRD-BP (E-Box) et induit sa transcription (Noubissi et al. 2010).

2.2.2. La régulation de la région 3'UTR de l'ARNm

Près de 10 % des ARNm ont dans leurs régions 3'UTR un élément cis, ARE ((A+U) - Rich Element), riche en adénosines et uridines tels que les ARNms des oncogènes, facteurs de



croissance, et des protéines impliquées dans la réponse au stress et la réponse immunitaire. Cette séquence dicte la durée de vie et ou la traductibilité de l'ARNm via l'interaction avec des protéines spécifiques, les ARE-BP (ARE-binding proteins) et dans quelques cas par des miARN. Les ARE-BP sont considérées comme des protéines navettes entre le cytoplasme et le noyau, sans activité enzymatique particulière et qui interviennent, via leurs interactions, dans la dégradation, la traduction, le stockage sélectif et la surveillance de l'ARNm. La région 3'UTR de *c-Myc* contient un ARE de catégorie 1 entre les nucléotides 2061-2141, formé de deux pentamères AUUUA dispersés dans un contexte riche en uridines en amont de chaque site de polyadénylation (Laird-Offringa et al. 1989). L'interaction ARE-protéines agit différemment sur le sort de l'ARNm de *c-Myc* en fonction des protéines recrutées. Ainsi, les 2 ARE-BP AUF1 (AU-rich binding factor) et TIAR (T-cells intracellular antigen 1 related protein) reconnaissent de manière compétitive la séquence riche (A+U) dans la région 3' non traduite du messenger et contrôlent de manière différentielle sa traduction. L'interaction AUF1-ARE permet d'augmenter la traductibilité de *c-Myc* et sa stabilité en formant des complexes avec différents facteurs comme les protéines de choc thermique Hsp27-Hsp70 (Heat shock proteins 27/70), mais aussi eIF4G et PABP (poly(A)-binding protein). Cette interaction induit aussi la prolifération cellulaire. Par contre, la liaison TIAR-ARE réprime sa traduction (B. Liao, Hu, and Brewer 2007). HuR (Human antigen R), une autre protéine de liaison à l'ARNm, facilite le recrutement du complexe formé par le miARN let-7 et RISC (RNA miRNA-induced silencing complex) sur un site adjacent de la région 3'-UTR de l'ARNm de *c-Myc*, ce qui permet la réduction à la fois des niveaux d'ARNm *c-MYC* et la synthèse protéique (H. H. Kim et al. 2009) (Otsuka et al. 2019).

Cependant, la présence du motif AUUUA n'est pas toujours suffisante pour marquer la dégradation du messenger. Ainsi, la perte de l'ARE de l'ARNm de *c-MYC* a été observée suite à des translocations dans des cancers hématologiques (López de Silanes, Quesada, and Esteller 2007). De même la délétion expérimentale de sa région 3'UTR n'augmente pas la stabilité de son ARNm (Langa et al. 2001). Ces résultats illustrent la complexité des mécanismes impliqués dans la dégradation des ARNm de *c-MYC*; en effet comme on l'a vu précédemment, il existe d'autres séquences comme celle de la région codante, CRD, reconnue par les CRD-BP qui sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses, notamment lorsque la voie β -caténine/TCF est activée. Ainsi plusieurs régions de l'ARNm sont impliquées dans la surveillance des taux cellulaires d'ARNm de *c-MYC* qui s'expriment différemment pour permettre rapidement la dégradation des ARNm lorsqu'elle s'avère urgente et nécessaire. Les cellules cancéreuses sont



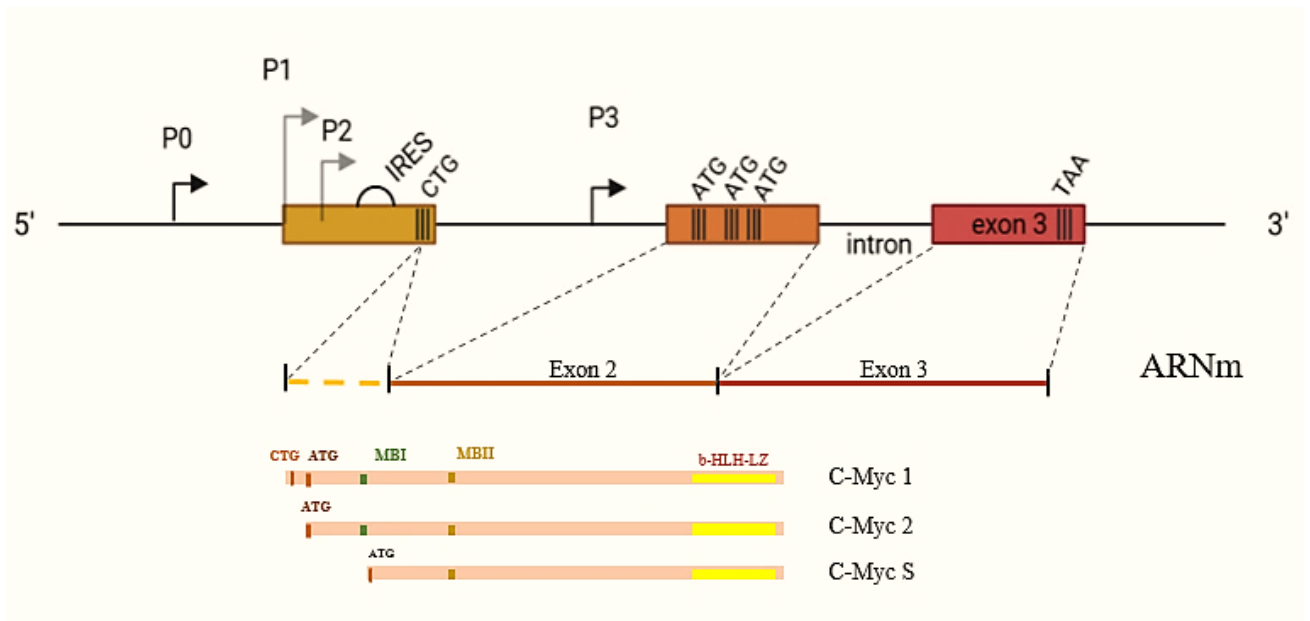


Figure 18: Représentation schématique du gène *c-MYC*, des transcrits et des 3 isoformes protéiques de *c-Myc*.

Le gène *c-MYC* contient trois exons (les rectangles) et deux introns (ligne horizontale). Il existe quatre promoteurs *P0*, *P1*, *P2* et *P3* (indiqués par des flèches) et trois codons d'initiation *CTG*, *ATG* et *ATG* qui génèrent 3 isoformes protéiques *c-Myc1*, *c-Myc2* et *c-MycS*, respectivement. *TAA* est le codon stop. *IRES*, Internal Ribosomal Entry site, permet une traduction coiffe-indépendante.



capables de déjouer ces mécanismes de surveillance pour au contraire maintenir ces taux indispensables à leur survie et leur développement.

3. Traduction des ARNm de *c-MYC*

Dans les cellules de mammifères *c-Myc* code pour deux phosphoprotéines principales *c-Myc1* ou p67, *c-Myc2* ou p64 (S R Hann and Eisenman 1984), et une isoforme plus courte appelée *c-MycS* (*c-Myc Short*) (Spotts et al. 1997). Ces différents isoformes partagent un domaine C-terminal similaire mais se différencient par leur région N-terminale (Stephen R. Hann et al. 1988). *c-Myc1* et *c-Myc2* proviennent d'une initiation alternative dans le cadre non-AUG (CUG) près de la fin de premier exon, connu comme un codon d'initiation non-canonique, et du premier AUG à l'exon 2, respectivement. Les protéines résultantes ont une longueur et un poids moléculaires différents : l'isoforme la plus longue, *c-Myc1*, est formée de 14 acides aminés supplémentaires par rapport à *c-Myc2* (453 acides aminés pour *c-Myc1* et 439 acides aminés pour *c-Myc2*). L'isoforme *c-MycS* est dépourvu de 100 acides aminés, y compris le MBI hautement conservé, ce qui empêche *c-MycS* d'activer la transcription par le biais du motif E-box (Spotts et al. 1997). Cette isoforme courte résulte d'un mécanisme de « leaky scanning ». Lors de ce processus, des ribosomes qui ne reconnaissent pas le premier codon AUG situé en 5', « balayent » jusqu'à trouver un autre codon AUG en aval. Le « leaky scanning » est utilisé régulièrement par les cellules eucaryotes notamment pour réguler l'expression des protéines de réponse au stress et permet à partir d'un même ARNm de produire des protéines ou isoformes différentes (Blin and Ricci 2016) (Figure 18).

Alors que comme nous l'avons déjà indiqué l'isoforme *c-Myc2* est la forme majoritaire en condition physiologique, les cellules prolifératives et certaines lignées cellulaires cancéreuses montrent un niveau similaire de la synthèse de *c-Myc2* et *c-MycS*. L'isoforme *c-Myc1* est plus importante lorsque les cellules approchent de l'arrêt de croissance à haute densité, tandis que la protéine *c-Myc2*, est impliquée dans les cellules à croissance rapide (S. R. Hann, Sloan-Brown, and Spotts 1992). Les deux isoformes *c-Myc1* et 2 peuvent se lier à l'EMS, mais *c-Myc1* peut également transactiver des gènes via un site non canonique trouvé dans l'élément amplificateur EFII de la longue répétition terminale du virus du sarcome de Rous (S. R. Hann et al. 1994b). Malgré le manque d'une partie de la région N-terminale, *c-MycS* a gardé certaines propriétés connues de *c-Myc*: la phosphorylation de la protéine, la localisation nucléaire, l'instabilité (une élimination par voie protéasomique avec une demi-vie de 30 minutes),



l'induction de l'apoptose (Xiao et al. 1998) (L. Chen et al. 2000) ; de plus, c-MycS a gardé la capacité de liaison avec Max via le motif bHLH-LZ, ce qui suggère que c-MycS est un inhibiteur dominant-négatif en se liant à certains éléments régulateurs de la transcription (Spotts et al. 1997). Cependant, c-MycS ne peut pas induire la phosphorylation de l'ARN polymérase II, ainsi il est défectueux pour la liaison de certains cofacteurs des formes complètes de c-Myc, tels que Skp2 (S-Phase Kinase Associated Protein 2), Dnmt3 α (DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 3 α), TRRAP (V. Cowling and Cole 2007). Des études *in vivo* chez des souris génétiquement modifiées hébergeant un minigène recombinant *c-Myc2/S* ont décrit des gliomes plus circonscrits lorsque l'expression de c-MycS était plus élevée par rapport au c-Myc2 dans les cellules cancéreuses (Jensen et al. 2003).

3.1. Traduction cap-dépendante des isoformes de c-Myc

La synthèse de la protéine c-Myc se fait, à partir des différents codons d'initiation, par une traduction classique cap-dépendante. La traduction est ainsi la dernière étape dans la voie d'expression génique qui se décompose de trois différentes étapes :

- (1) **L'initiation** : Le rassemblement des sous-unités de ribosomes sur l'ARNm mature et le positionnement du codon d'initiation
- (2) **L'élongation** : La lecture de l'ARNm par triplet et la synthèse de la protéine
- (3) **La terminaison** : La libération de la protéine
- (4) **La dissociation du ribosome** : Le recyclage des sous-unités ribosomiques et leurs prises en charge par des facteurs d'initiation (40S est associée aux facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 et 60S est associée à eIF6).

Le pré-complexe d'initiation 43S ou PIC (Pre-initiation complex) est formé de la petite sous-unité ribosomique 40S, d'eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) et du complexe ternaire d'initiation lui-même constitué de l'ARNt chargé de la méthionine couplée au GTP. La coiffe est reconnue par l'eIF4E du complexe eIF4F (eIF4A, eIF4E, eIF4G, eIF4B) suivi par la formation et la liaison du complexe 43S à l'ARNm. L'eIF4B stimule l'activité hélicase d'eIF4A qui ouvre la structure secondaire des régions 5'UTR des ARNm. Le facteur eIF4G interagit avec PABP présent sur la queue poly(A) permettant la circularisation du messager. Le complexe 43S scanne le long du messager en balayant de la région 5'UTR vers la 3'UTR cherchant un codon d'initiation optimal. La grande sous-unité 60S et eIF5B-GTP se fixent sur la petite sous-unité ribosomique pour former le complexe 80S prêt à démarrer la traduction. Des liaisons



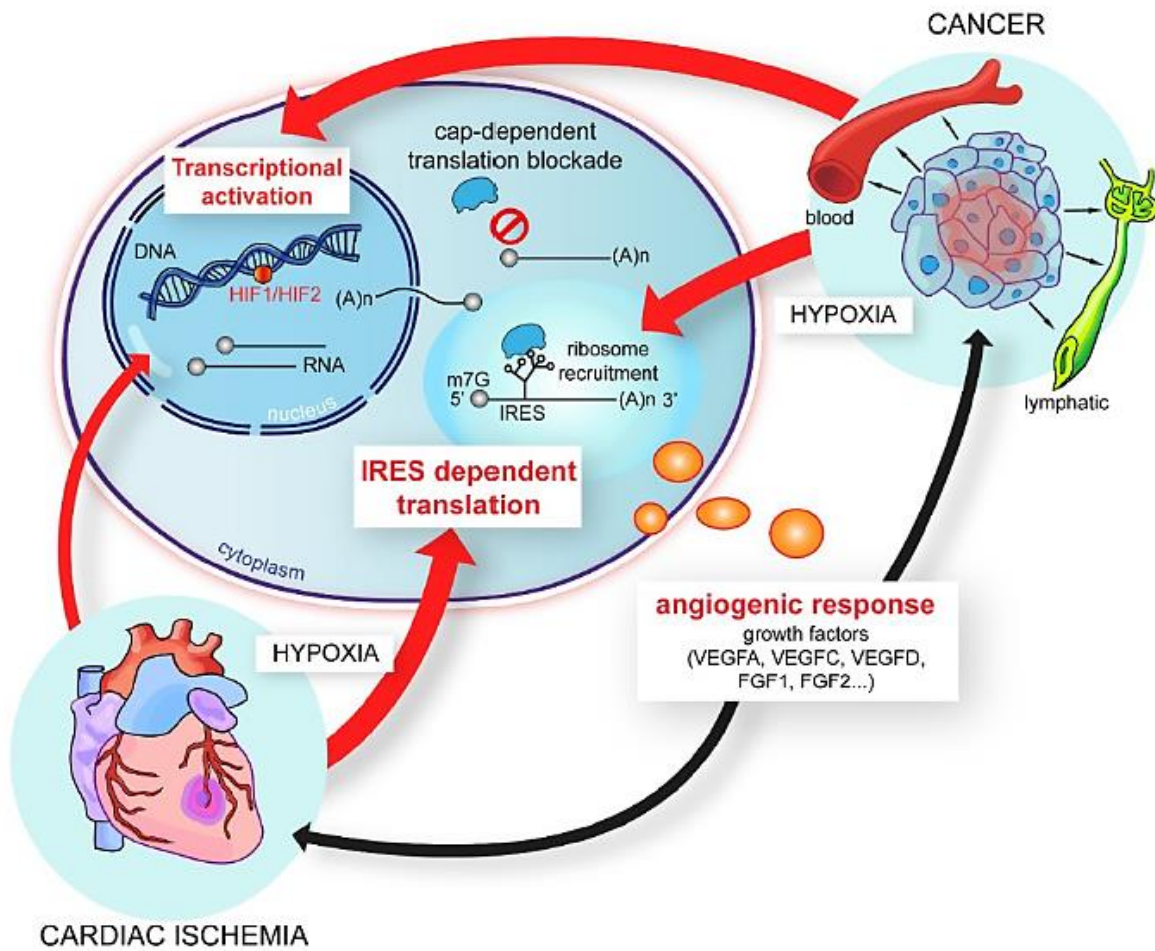


Figure 19: Activation de la traduction dépendante de l'IRES en réponse à l'hypoxie et aux conditions de stress.

Durant l'hypoxie, un switch peut avoir lieu pour économiser de l'énergie : une transition de la traduction coiffe-dépendante vers la traduction coiffe-indépendante. Dans le cas de l'hypoxie tumorale, les facteurs de croissance angiogéniques FGF et VEGF sont synthétisés à la fois par activation transcriptionnelle et via la traduction dépendante de l'IRES, alors que dans le cas de l'ischémie cardiaque, les cardiomyocytes en hypoxie engagent majoritairement la régulation traductionnelle (IRES). Il en résulte une angiogenèse rapide qui contribue à la survie des cardiomyocytes (Godet et al. 2019).



peptidiques relient les acides aminés ajoutés au fur et à mesure. Le complexe 80S se dissocie au niveau du codon stop (UAA, UGA, UAG) et la protéine néo-synthétisée se libère dans le cytoplasme (Jackson, Hellen, and Pestova 2010).

3.2. Traduction cap-indépendante des isoformes de c-Myc ou traduction IRES-dépendante

La traduction des isoformes protéiques de c-Myc implique, comme nous venons de le voir, la traduction cap-dépendante connue chez des eucaryotes. Cependant, des études antérieures ont démontré la présence d'un site interne d'entrée des ribosomes (IRES, Internal Ribosome Entry Site) dans la région 5' non-traduite de l'ARNm P2 situé directement en amont de CUG (Figure 18) (Cencig et al. 2004). Il est bien connu que les proportions de ces deux modes de synthèse protéique ne sont pas équivalentes. Dans des conditions normales, le balayage ribosomal canonique dépendant de la coiffe est utilisé, alors que le mécanisme de traduction non canonique semble être réservé à la synthèse de produits génétiques particuliers et dans des conditions spécifiques (le stress, l'hypoxie, la tumorigenèse...) (Figure 19) (Cencig et al. 2004). Ainsi le mécanisme de traduction IRES dépendant permet aux cellules de s'adapter rapidement à des changements métaboliques.

Les IRES sont des séquences d'ARNm capables de recruter la sous-unité 40S indépendamment de la présence d'une coiffe. Les IRES ont été découverts dans les ARN viraux, mais chez les mammifères ces séquences ont été identifiées pour des gènes dont les produits protéiques sont impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire comme c-Myc, FGF-2, PDGF et VEGF (Stoneley et al. 1998).

Tous les membres de la famille Myc possèdent un IRES dans leur 5'UTR qui participe à l'initiation de la traduction de l'ARNm correspondant. Même parmi les membres de la famille qui sont proches les uns des autres, comme c-Myc et L-Myc, la structure secondaire suggérée des IRES n'est pas conservée (Le Quesne et al. 2001) (Jopling et al. 2004). L'IRES de *c-MYC* promeut la traduction cap-indépendante des cadres de lecture ouverts (ORF) de c-Myc1/c-Myc2.

3.2.1. Localisation, structure et rôle de l'IRES des transcrits de *c-MYC*

Les messagers ayant une longue région 5'UTR sont supposés être mal traduits en raison de leur capacité réduite à s'associer au complexe de liaison à la coiffe eIF4F. Or, la longue



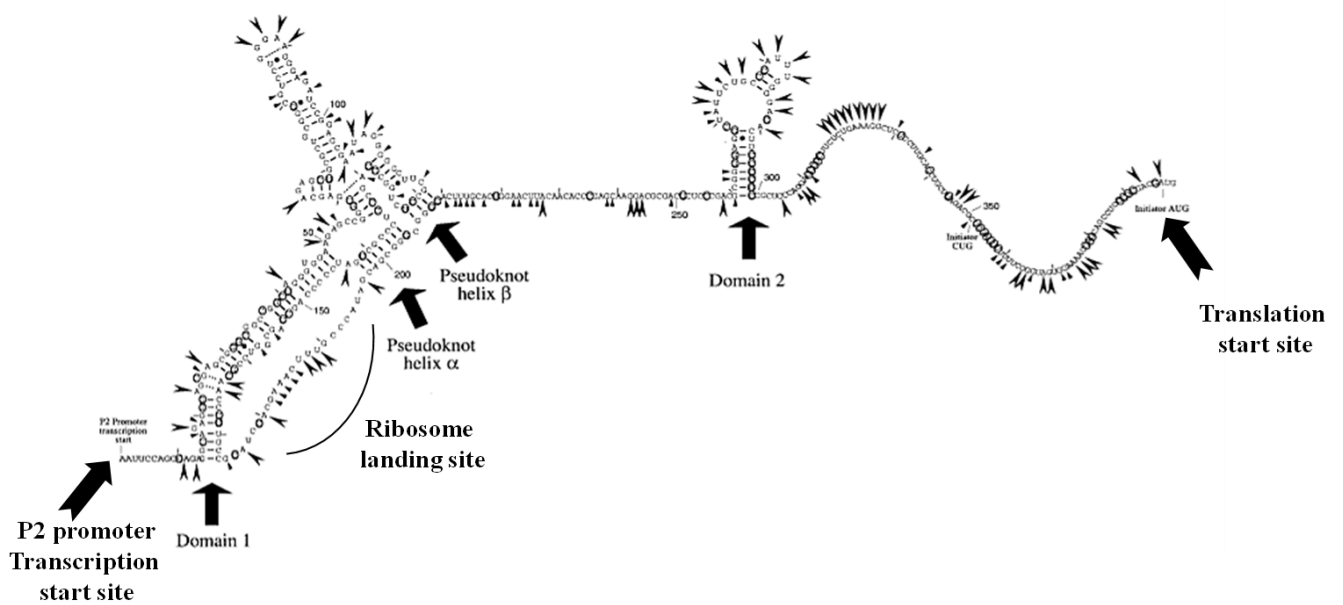


Figure 20: Modèle de la structure secondaire de l'IRES de c-MYC humain

L'IRES de c-MYC contient 2 domaines structuraux nécessaires à son activité maximale liés par une région non structurée. Dans cette région se trouve la fenêtre d'entrée du ribosome (Ribosome landing site). Le domaine 1 est constitué d'une boucle apicale (GNNRA), et un double pseudo-nœud (α et β). Le domaine 2 contient une autre boucle apicale (AUUU). Le ribosome scanne le long de la région jusqu'au point de départ de la traduction situé en aval du second domaine. (Modifiée (Le Quesne et al. 2001; Stoneley and Willis 2004)).



région 5' non traduite de *c-MYC* (riche notamment en GC) contient une grande région structurée qui englobe un site d'entrée interne (IRES), connu dans le cas des ARN structurés en épingles à cheveux. Ce site se trouve dans la région 5' de l'exon 1 en amont de CUG (codon d'initiation de *c-Myc1*) entre les nucléotides 363-394.

Un modèle prédictif a suggéré une structure de l'IRES de *c-MYC* formée de deux domaines structuraux (Domaine 1 et Domaine 2) reliés par une longue région non structurée (Figure 20). Le domaine 1 contient une boucle apicale (GNNRA), et un motif double pseudo-noeud (α et β) chevauchant qui est topologiquement unique, mais dont la suppression n'affecte pas la fonction de l'IRES. Cependant des mutations au niveau du pseudo-noeud α augmente significativement la fonction de l'IRES. Ainsi il est suggéré que la présence du pseudo-noeud α serait inhibitrice de la fonction de l'IRES. Le deuxième domaine, le plus petit, contient une autre boucle apicale (AUUU). Cette étude montre également l'exigence des deux domaines pour une activité maximale de l'IRES. Il a été précédemment montré que l'IRES de *c-MYC* faisait partie des IRES où la sous-unité 40S ne se pose pas au premier codon d'initiation (CUG) mais elle est capable de scanner le transcrit pour aller se poser sur un autre codon d'initiation (AUG) situé en aval (Jackson et al. 1994). Comme plusieurs IRES viraux, la fenêtre d'entrée du ribosome a été finalement située dans la longue région non structurée, puis il va scanner le transcrit jusqu'au codon d'initiation AUG déroulant les autres éléments structuraux y compris le double pseudo-noeud et le domaine P2. D'autres éléments de l'IRES de *c-MYC* ont été identifiés comme répresseurs de la fonction IRES (Le Quesne et al. 2001) (Stoneley and Willis 2004).

Un criblage empirique à haut débit réalisé sur des cellules a permis l'identification des composés capables d'inhiber sélectivement la traduction médiée par l'IRES de l'IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor). Ces composés bloquent complètement la traduction protéique de l'IGF1R médiée par l'IRES et sont également très actifs contre l'IRES de *c-Myc*. Le traitement de cellules SUM159, exprimant un niveau élevé de *c-Myc*, avec l'un des composés entraîne une diminution impressionnante de *c-Myc2* (isoforme majeure), tout en stimulant simultanément la synthèse de *c-Myc1* (isoforme mineure). Ce résultat semble suggérer que l'IRES de *c-MYC* contrôle non seulement l'efficacité de la traduction, mais aussi le choix du codon d'initiation de la traduction qui a un impact sur le rapport *c-Myc1/c-Myc2* ; de plus, il semble que l'IRES de *c-MYC* favorise préférentiellement la synthèse à partir du codon d'initiation canonique AUG (Vaklavas et al. 2015). Cette suggestion concorde avec la conclusion d'une recherche précédente qui a démontré que la surexpression de eIF4E augmente préférentiellement l'expression de *c-Myc1* au codon de départ CUG par un mécanisme de



balayage, tandis que c-Myc2 est traduit par le repositionnement interne du ribosome médié par IRES (Carter, Jarquin-Pardo, and De Benedetti 1999). De plus, ce mécanisme d'initiation non-canonique pourrait avoir un rôle en compensant l'expression du messager et permettre une réponse rapide à différents stimuli pour lesquels la traduction dépendante de la coiffe est bloquée, en particulier le stress, ou l'apoptose.

3.2.2. Conditions d'activation de l'IRES de *c-MYC*

Dans certaines conditions comme le stress, l'apoptose, la privation de sérum, la traduction dépendante de la coiffe est inhibée en raison du clivage du facteur eIF4G. Ces conditions poussent la cellule à recourir à un autre choix pour assurer la synthèse protéique comme un moyen d'adaptation à des changements métaboliques par une réponse rapide. Elle active ainsi la traduction indépendante de la coiffe surtout de messagers codant pour des protéines du choc thermique, des oncogènes, des facteurs d'angiogenèse, des facteurs de croissance qui ont une structure IRES dans leur région 5'UTR.

De nombreuses études ont confirmé que l'expression renforcée de c-Myc sensibilise les cellules à une série de stimuli apoptotiques. Lors de l'activation de la voie de l'apoptose par TRAIL, on observe un niveau stable de c-Myc dans les cellules traitées. La maintenance du niveau de la protéine c-Myc n'était pas due à une augmentation de la demi-vie de la protéine c-Myc ou à une augmentation du niveau de son messager. Cette observation suggère fortement que le niveau de protéine c-Myc a été maintenu en raison d'un recrutement de ribosomes par l'IRES de *c-MYC*. Dans ces conditions d'apoptose il a été démontré que c'était la MAP-K/p38 (Mitogen-Activated Protein Kinases) qui était activée. L'inhibition de la kinase p38 dans les cellules HeLa montre clairement une diminution de la traduction de *c-Myc* IRES-dépendante associée à une diminution de l'expression de c-Myc (Stoneley, Chappell, et al. 2000) (Subkhankulova, Mitchell, and Willis 2001). Une autre étude *in vivo* montre que l'IRES de *c-MYC* est principalement actif pendant l'embryogenèse et qu'il est régulé à la baisse à un stade avancé du développement (Laurent Créancier et al. 2001).

La traduction classique est également réduite par les conditions hypoxiques. Lang et ses collègues montrent que l'activité de l'IRES *c-Myc* fonctionne toujours dans des conditions hypoxiques et que cette activité diffère selon les lignées cellulaires. Vraisemblablement, cette différence dépend de facteurs limitants qui participent à la fonction de l'IRES, appelés ITAFs (IRES-trans acting factors) (détaillés ci-dessous) (Lang, Kappel, and Goodall 2002). Ensemble,



ces études montrent que la dérégulation de l'IRES de *c-MYC* peut contribuer à la formation de tumeurs.

3.2.3. Activation de l'IRES de *c-MYC* et ITAFs

Un des mécanismes d'action de l'IRES *c-Myc* suggère le recrutement direct du ribosome au niveau du codon de démarrage de la traduction, indépendamment de la coiffe 5' et sans besoin de la présence du facteur eIF4G (Stoneley, Chappell, et al. 2000). Un deuxième mécanisme propose un recrutement du complexe de la traduction en un point beaucoup plus proche du codon initiateur, ou à proximité immédiate de celui-ci suivi ensuite d'un court balayage pour positionner le codon initiateur, toujours indépendamment de la coiffe et en contournant les séquences 5'-non traduites hautement structurées (Le Quesne et al. 2001).

Dans la traduction classique, comme vu précédemment, la queue poly(A) peut servir de médiateur à la circularisation de l'ARNm en joignant les deux côtés 5' et 3' par le biais d'un complexe de pontage entre eIF4E, eIF4G et PABP. Cette circularisation sert à améliorer la traduction en facilitant les différentes étapes de la traduction et du recyclage des ribosomes. Néanmoins, il a été démontré que la queue poly(A) améliore la traduction pilotée par l'IRES de *c-Myc* d'une manière différente. L'assemblage du complexe 80S est stimulé par la queue poly(A) sur l'IRES de l'ARNm de *c-MYC*. La queue poly(A) renforce l'action de l'IRES même après le clivage d'eIF4G, ou la déplétion de PABP. Cela indique que le complexe de pontage PABP-eIF4G n'est donc pas obligatoire pour la traduction indépendant de la coiffe et n'est pas requis pour l'amélioration de l'IRES par la queue poly(A) (Thoma et al. 2008).

L'activité des IRES dépend de facteurs d'initiation canoniques et de protéines cellulaires auxiliaires appelées ITAFs ou facteurs transactivateurs des IRES. Ils font partie d'un complexe ribonucléoprotéique appelé « IRESome » qui a été signalé pour activer la traduction dépendante de l'IRES (Stoneley, Subkhankulova, et al. 2000). Les ITAFs sont des acteurs incontournables, spécifiques du tissu, qui jouent un rôle important dans le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S pour promouvoir la synthèse sélective des protéines. Ils agissent en trans pour moduler l'activité de l'IRES. Ils peuvent être aussi bien activateurs qu'inhibiteurs. Il a été proposé qu'il existe à la fois des ITAFs spécifiques qui contrôlent l'activité de groupes d'IRES et des ITAFs généraux requis par la majorité des IRES cellulaires tels que PTB (Pyrimidine Tract Binding protein).



Il existe plusieurs classes d'ITAFs et les ITAFs de l'IRES de *c-Myc* se retrouvent dans les 2 principales (Godet et al. 2019).

La première classe regroupe des protéines nucléaires capables de subir un transfert vers le cytoplasme pour réguler la traduction IRES-dépendante. La grande majorité des ITAFs de cette classe appartient à la famille des hnRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein). La ribonucléoprotéine hnRNPK est un ITAF de l'IRES *c-MYC* mais aussi une protéine essentielle des paraspeckle (corps nucléaires qui se relocalisent à la périphérie du noyau lorsque la traduction classique est inhibée et apparaissant lors du stress ou certains processus physiologiques comme la différenciation cellulaire, le stress hypoxique). hnRNPK a été identifiée comme un transactivateur de l'IRES de *c-MYC* lorsqu'elle est ajoutée en combinaison avec une protéine en amont de N-Ras et *unr-interacting protein*. La famille protéique PCBP1/2 (poly(rC) binding protein 1/2), exprimée durant l'apoptose, a un effet similaire sur la fonction IRES par une interaction directe avec l'ARNm de *c-MYC*. Une IRES *c-MYC* mutée, qui imite la version mutée (C à T) prévalente chez les patients atteints de myélome multiple, lie plus efficacement hnRNPK et PCBP2 (hnRNPE2) *in vitro et in vivo* (Evans et al. 2003). Il est probable que les ITAFs soient activés par de multiples événements de signalisation. Il a été démontré *in vitro et in vivo* que la protéine hnRNPK est activée après interaction avec la kinase *c-Src*, ce qui entraîne l'activation de *c-Src* et la phosphorylation de la tyrosine de la hnRNPK. Ceci soulève la possibilité de régulation de hnRNPK par des changements de phosphorylation pour affecter la fonction IRES de *c-MYC* (Spriggs et al. 2005). PRMT5 (Protein arginine methyltransferase 5), une arginine méthyltransférase de type II, joue un rôle de répresseur de la transcription et de régulateur d'épissage en ajoutant un groupe méthyle sur des histones. La plupart des gènes régulés par PRMT5 favorisent la diméthylation de hnRNPA1 permettant ensuite l'interaction de hnRNPA1 avec l'IRES de l'ARN de *c-MYC*. Cette interaction hnRNPA1-*c-MYC*-IRES favorise la traduction indépendante de la coiffe (G. Gao, Dhar, and Bedford 2017). Cependant, l'AKT activée favorise la phosphorylation de hnRNPA1 sur ser199 *in vitro*. Le hnRNPA1 phosphorylé était alors incapable de soutenir la fonction IRES (Jo et al. 2008). Ces résultats indiquent que des modifications post-traductionnelles peuvent affecter l'activité des ITAF et ainsi avoir un impact sur la régulation de l'activité des IRES.

Les protéines PTB1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1), PSF (PTB-associated splicing factor), YB-1 (Y-Box binding protein 1), GRSF-1 (G-rich RNA sequence binding factor 1) qui font aussi partie de la première classe d'ITAFs jouent de nombreux rôles dans la traduction, l'épissage des ARNm, leur stabilité et leur localisation dans les cellules. De plus, ces protéines



jouent également le rôle d'activateurs de l'IRES *c-MYC* étant des ITAFs *in vivo et in vitro*. PTB1 ou hnRNPI est aussi requise par de nombreux IRES cellulaires. PSF est un facteur d'épissage requis au début de la formation des spliceosomes, qui forme un complexe avec PTB et un hétérodimère avec p54^{nrb}. PTB-1 et YB-1 ont montré une plus grande affinité pour l'ARN contenant la version mutée de l'IRES *c-MYC*, similaire à l'IRES muté trouvé dans le myélome multiple, comparé au type sauvage. Ces deux ITAF agissent en synergie pour entraîner une plus forte expression de la luciférase en aval dans une construction gène-rapporteur luciférase (Laura C. Cobbold et al. 2008) (L. C. Cobbold et al. 2010).

La deuxième classe d'ITAFs regroupe des protéines cytoplasmiques dont la fonction est liée à la machinerie de la traduction, avec en grande majorité des protéines ribosomiques ou associées aux ribosomes. Parmi les facteurs d'initiation connus pour activer l'IRES *c-MYC*, on peut citer l'eIF3, l'eIF4A ou l'eIF4G1 impliqués dans l'activation de cet IRES comme d'autres IRES lors de conditions hypoxiques ou apoptotiques (Godet et al. 2019). La protéine ribosomale eS25 (Ribosomal protein S25 par *Rps25*) fait partie de cette 2^e classe d'ITAFs impliqués dans l'activation de l'IRES *c-MYC*. eS25 est un ITAF capable d'entraîner le recrutement des ribosomes sur les IRES virales et cellulaires et est nécessaire pour l'activation de l'IRES de *c-MYC* notamment au cours du stress du réticulum endoplasmique (Hertz et al. 2013) (Shi et al. 2016).

4. Contrôle post-traductionnel de c-Myc

L'expression de c-Myc est étroitement contrôlée pour permettre une fonction normale des cellules. La régulation de cette expression se situe aussi au niveau post-traductionnel par des modifications telles que les phosphorylations, glycosylations, ubiquitinations ou encore acétylations. Ces mécanismes peuvent affecter directement ou indirectement la stabilité de la protéine c-Myc et aussi influencer directement l'activité de cette dernière.

4.1. Phosphorylation de c-Myc

Dans de nombreux cas, les protéines qui sont dégradées par la voie ubiquitine/protéasome sont d'abord « marquées » par phosphorylation sur des résidus spécifiques, ce qui permet leur reconnaissance par la machinerie d'ubiquitination. Cependant le statut de phosphorylation de c-Myc peut aussi influencer ces activités biologiques.



Les phosphorylations de c-Myc impliquées dans sa dégradation

La phosphorylation de c-Myc est clairement impliquée dans la régulation des activités biologiques de c-Myc et sa stabilité. Deux sites de phosphorylation de c-Myc, la théonine 58 (Thr58) et la sérine 62 (Ser62), situés au sein de la boîte MBI N-terminale et très conservés dans la famille c-Myc, sont impliqués dans le contrôle de la stabilité de la protéine. La glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) est impliquée dans la phosphorylation de la Thr58, et la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinases) Raf-MEK-ERK dans celle de la Ser62. Les études ont montré que la phosphorylation de la Ser62 stabilise c-Myc, alors que celle de la Thr58 la déstabilise. De plus, la phosphorylation de Thr58 nécessite une phosphorylation initiale de la Ser62. Lors de signalisation induisant la synthèse de c-Myc et prolifération cellulaire, comme des signaux mitogéniques, la voie Raf-MEK-ERK est activée. En phosphorylant c-Myc sur la Ser62, ERK stabilise la protéine. L'activation de Ras empêche la phosphorylation de la Thr58 en activant la voie PI3K – AKT, (phosphatidylinositol-3-OH kinase-protein kinase B) bloquant l'activité de GSK-3 β (R. Sears et al. 2000) (Gregory and Hann 2000) (R. C. Sears 2004). Ainsi la stabilité de c-Myc est maintenue et s'accompagne d'une augmentation du taux de c-Myc dans les cellules. Plus tard, après la phase G2 du cycle, la signalisation d'AKT diminue, de qui permet la réactivation de GSK-3 β , déterminant la phosphorylation de la Thr58 qui va favoriser la dégradation de c-Myc. D'autres voies de récepteur tyrosine kinase, comme celle de l'insuline et des facteurs de croissance assurent la stabilisation de la protéine c-Myc en inhibant la fonction de la GSK-3 β .

Ainsi la phosphorylation de la Thr58 par la GSK-3 β apparait comme un évènement clé de la régulation des taux cellulaires de c-Myc. Il n'est pas surprenant que ces sites critiques de phosphorylation, Thr58 et Ser62, aient été fréquemment mutés dans des cancers, comme le lymphome de Burkitt. Contrairement au type sauvage c-Myc, la substitution de la Thr58 par l'alanine (c-Myc^{T58A}) augmente la stabilité de la protéine c-Myc et son activité transformante dans les cultures cellulaires et les modèles de souris. Cette activité transformante accrue serait due à la capacité réduite de c-Myc^{T58A} à provoquer l'apoptose et à l'augmentation claire de la demi-vie de la protéine. L'analyse de ce mutant c-Myc^{T58A} a révélé que, en empêchant la phosphorylation de Thr58, cela inhibait l'ubiquitinylation de c-Myc (Lutterbach and Hann 1994). Ce mutant présentait aussi une augmentation de la phosphorylation de la Ser62, expliquant la forte augmentation de la stabilité de la protéine. Cependant, la substitution de la Ser62 par une alanine, diminue l'activité oncogénique de c-Myc mutée sans affecter le rôle de c-Myc dans l'induction de l'apoptose. c-Myc^{S62A} a une demi-vie similaire à celle de la c-Myc



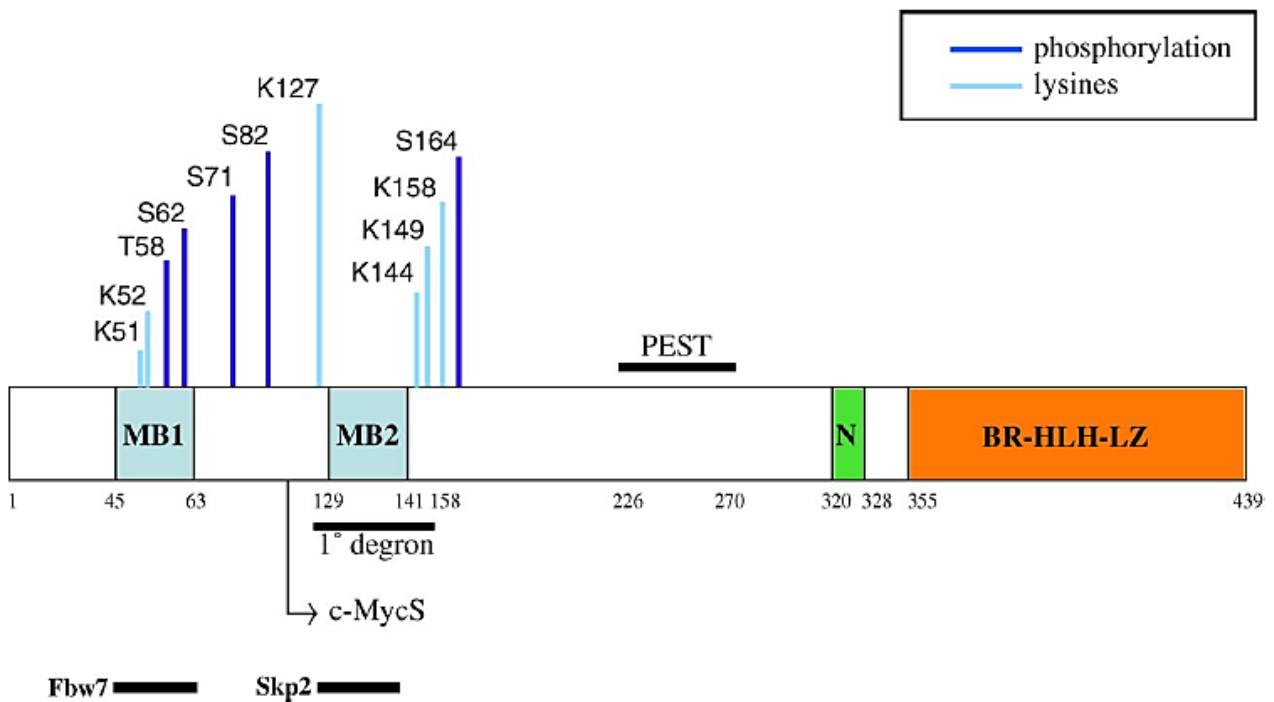


Figure 21: Structure schématique de la protéine *c-Myc* avec les sites phosphorylés et ubiquitinylés visés par les modifications post-traductionnelles.

Les fonctions de *c-Myc* en tant qu'oncogène lors de sa surexpression peuvent être dues à une stabilité accrue de la protéine *c-Myc*. Sa stabilité peut être régulée par la voie du protéasome ubiquitine/26 S et la phosphorylation séquentielle de *c-Myc* à la Ser62 (par ERK) et la Thr58 (par GSK-3 β). Ces phosphorylations de *c-Myc* permettent la liaison de Fbw7 spécialement aux peptides MB1 (Myc Box 1) et ensuite l'ubiquitination de *c-Myc* par son activité ubiquitine ligase. De même, Skp2 se lie à MB2 pour induire son ubiquitination. *c-Myc* poly-ubiquitinylée (K48) est prête à la dégradation par le système ubiquitine-protéasome. « Degron » est constitué de résidus sérine et thréonine étroitement espacés et hautement conservés qui sont phosphorylés. D'autres sites de phosphorylations et d'ubiquitinations ont été aussi identifiés et peuvent contrôler la stabilité et la fonction de *c-Myc*. PEST, un segment riche en résidus proline, acide glutaminique, sérine et thréonine. Sa délétion n'affecte pas l'ubiquitination de *c-Myc* mais sa présence augmente la stabilité de la protéine (Hann 2006).



type sauvage et n'a pas d'effet sur l'ubiquitination (R. C. Sears 2004). Comme la phosphorylation de la Thr58 nécessite une phosphorylation initiale de la Ser62, il a été suggéré le rôle d'une phosphatase dans la régulation de la stabilité de c-Myc. La protéine phosphatase 2A (PP2A) a été confirmée dans ce rôle et dans la déphosphorylation de la Ser62 et donc dans la déstabilisation de c-Myc (Silverstein et al. 2002) (R. C. Sears 2004). Plus précisément, la protéine c-Myc phosphorylée sur la Thr58 et la Ser65 est reconue sur ces 2 sites par l'isomérase PIN1 (Prolyl cis/trans isomerase). Cela provoque le changement de conformation de c-Myc par l'isomérisation de la proline-63 de cis à trans. Ce changement conformationnel permet l'accès de PP2A sur la Ser62 et sa déphosphorylation. Le maintien de la phosphorylation de la Thr58 permettant l'ubiquitination de c-Myc par la Fbw7 ligase et la dégradation protéasomique subséquente (Arnold et al. 2009).

Bien que la plupart des travaux sur la phosphorylation de c-Myc se soient concentrés sur la phosphorylation de Ser62 et Thr58, un certain nombre d'autres sites de phosphorylation de c-Myc ont été identifiés (Figure 21). En utilisant la cartographie bidimensionnelle des phosphopeptides, trois autres sites de phosphorylation ont été identifiés dans le domaine TAD de c-Myc (extrémité N-terminale) Ser71, Ser81, et Ser164, ainsi que la sérine au niveau de la région centrale Ser293. Deux clusters ont également été identifiés comme étant des sites de phosphorylation, 240cl (Thr247/Thr248/Ser249/Ser250/Ser252) localisé dans le domaine central et 340cl (Thr343/Ser344/Ser347/Ser348) localisé dans l'extrémité C-terminale. Les acides aminés de ces deux clusters sont ciblés par la caséine kinase 2 (CK2, Casein Kinase 2) mais la fonction biologique de ces résidus est peu connue. MAPK n'est pas la seule enzyme qui peut phosphoryler la Ser62 de c-Myc. D'autres travaux suggèrent le rôle d'autres kinases comme la CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1) ou la JNK (c-jun-NH₂-kinase) pour promouvoir un arrêt cellulaire. La phosphorylation de la Ser62 par la CDK1 se produit au cours du cycle cellulaire engagé dans la phase de mitose ; ainsi l'inhibition de la CDK1 réduit fortement la phosphorylation de la Ser62 dans des cellules bloquées en G2/M. Par conséquent, la voie de la CDK1 serait déterminante dans phosphorylation de c-Myc pendant les phases G2 et M. Cela permettrait, dans une phase du cycle où l'activité de l'AKT est réduite, à la GSK-3 β de phosphoryler la Thr58 pour favoriser la dégradation de c-Myc. Contrairement à la voie ERK qui phosphoryle la Ser62 en condition de stimuli mitogéniques, la JNK phosphoryle la Ser62 mais aussi la Ser71 lors de situations de stress à l'ADN, et sans doute de façon cycle dépendante. Ainsi, ce sont les conditions d'activation ou d'environnement cellulaires qui déterminent quelle(s) kinase(s) va cibler c-Myc. Par exemple lors de stimuli apoptotiques, l'activité des



kinases JNK et GSK3- β sont augmentées, alors que celle de CDK1 est inhibée. Par conséquent, on s'attend à ce que ces stimuli favorisent un déplacement du statut de phosphorylation de c-Myc d'une forme prédominante de la Ser62 vers la phosphorylation de la Thr58/Ser62/Ser71. Cependant, il reste beaucoup d'inconnues dans la compréhension du rôle de ces kinases sur le statut de phosphorylation et leurs conséquences sur la fonction et/ou la stabilité de c-Myc. De plus, la contribution relative des différentes kinases reste à déterminer. De même, il n'y a pas de kinase connue qui phosphoryle Ser81 et Ser164 (Revue (Stephen R. Hann 2006)) (Wasylishen et al. 2013).

Enfin, de nombreuses autres phosphorylations ont été caractérisées dans l'extrémité C-terminale, en particulier dans le domaine HLH-LZ au niveau des Thr358, Ser373 et Thr400.

La question qui s'est posée, suite à la découverte des nombreux sites potentiels de phosphorylations de c-Myc et des mutations retrouvées sur ces sites dans différents cancers, était de connaître l'impact de ces phosphorylations sur les activités biologiques de l'oncogène c-Myc.

Les mutations de la Thr58 retrouvées dans le lymphome de Burkitt, ainsi que des aa autour de cette thréonine dans la même région N-terminale de *c-MYC*, ont très vite été associées à une plus grande stabilité de la protéine, mais aussi une plus forte activité transformante.

Comme on l'a vu précédemment, les signaux extracellulaires de prolifération induisent la phosphorylation de la Ser62 via la voie Ras/Raf-MEK-ERK. Pour expliquer un rôle direct sur la progression du cycle, il a été suggéré que c-Myc phosphorylée sur la Ser62 activerait des gènes cibles favorisant la progression en G1, comme *E2F*. De la même façon la phosphorylation de la Ser62 par la voie CDK1/cycline B activerait des gènes cibles favorisant la progression en G2. Mais les mécanismes ne sont pas connus et la part de l'augmentation de la stabilité de c-Myc par rapport à des régulations de gènes dans la progression du cycle n'était pas déterminée (Stephen R. Hann 2006). Dans des conditions de stress, PAK2 (P21 (RAC1) Activated Kinase 2) bloque la capacité de c-Myc à soutenir la prolifération cellulaire en dissociant c-Myc/Max et l'ADN.

Des études ont aussi analysé l'impact de la phosphorylation de c-Myc sur son activité apoptotique. La kinase JNK est impliquée dans les signalisations d'apoptose de différents modèles cellulaires soumis à des signaux apoptotiques. JNK favorise la phosphorylation de c-Myc à la fois sur la Ser62 et la Ser71. Alors que la mutation Ser62Ala seule ne modifie pas la réponse apoptotique de c-Myc, la double mutation Ser62Ala/Ser71Ala réduit significativement



la mort cellulaire des cellules de la lignée murine de fibroblastes embryonnaires NIH/3T3, exposées à une irradiation UV (Noguchi et al. 1999). La phosphorylation de la Ser71 par la JNK est en effet apparue plus importante que celle de la Ser62 pour induire l'apoptose suite à une exposition aux UV notamment. Finalement si la phosphorylation de la Ser71 semble avoir un rôle clair dans la fonction pro-apoptotique de c-Myc, un effet direct de la kinase JNK sur la progression du cycle ne peut pas être écarté (Wasylishen et al. 2013).

Pour dissocier les effets sur la stabilité/dégradation de la protéine de ceux affectant directement la fonction biologique de c-Myc, et notamment ses activités de facteur de transcription, les chercheurs ont construit des modèles cellulaires surexprimant des mutants de c-Myc où des résidus sérine ou thréonine avaient été substitués par de l'alanine, tout en ne modifiant pas la stabilité de la protéine mutée. Ainsi, contrairement au mutant c-Myc^{T58A} caractérisé par une augmentation de la demie-vie d'environ 30 à 60 minutes, les mutants présentant la double mutation c-Myc^{S71A} /c-Myc^{S81A} et du cluster MYC-4A (c-Myc^{T343A/S344A/S347AS348A}) ont un gain de fonction oncogénique sans modification de leur stabilité. En revanche, une mutation individuelle la Ser71Ala et de la Ser81Ala ne produisaient par une transformation cellulaire accrue. L'étude génomique de ces mutants a permis de relier leur plus fort pouvoir oncogénique à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de c-Myc ; en effet l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de *c-MYC*, mais aussi d'autres gènes est fortement augmentée dans les cellules présentant ces mutants. Les mécanismes précis de ces effets oncogéniques renforcés restent à déterminer mais ces régulations géniques sont indépendantes de la liaison de c-Myc avec Max sur l'ADN (Wasylishen et al. 2013).

4.2. Ubiquitination

L'ubiquitination (ou ubiquitylation) est un mécanisme de régulation post-traductionnelle des protéines qui permet, comme nous le décrivons dans le paragraphe sur la dégradation de c-Myc, de cibler et d'adresser des protéines à la machinerie du protéasome permettant leur dégradation (Ub-proteasome system, UPS). La cascade d'ubiquitination d'une protéine nécessite l'action séquentielle de trois enzymes: l'enzyme activatrice E1 qui est très conservée, l'enzyme de conjugaison E2 commune à de multiples cibles et la ligase E3 qui contient le site de reconnaissance spécifique du substrat.

La première ubiquitine ligase identifiée pour c-Myc et impliquée dans sa protéolyse, est le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2} (S-Phase Kinase Associated Protein 2) (S. Kim et al. 2003).



Les ubiquitine ligases SCF (Skp1- Cullin1-F-box protein) constituent la plus grande famille de E3 ubiquitine ligases chez les mammifères. Chaque membre consiste en un complexe formé d'une protéine adaptatrice SKP1, d'une protéine d'échafaudage, la culline-1, d'une protéine F-box d'une famille de 69 membres qui sert de composant déterminant le substrat, et de Rbx1, qui contient le domaine à structure en « doigt de zinc » (RING finger -Really Interesting New Gene) pour le recrutement de l'enzyme E2 (Ravid and Hochstrasser 2008). De manière intéressante, un double rôle a été ensuite attribué à l'ubiquitylation de c-Myc par SKP2 ; en effet, en plus de son rôle dans la dégradation de c-Myc, il a été démontré que cette ubiquitination augmente l'activité transcriptionnelle de c-Myc de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, alors que la perte de SKP2 peut non seulement augmenter les taux de c-Myc et son activité pro-apoptotique. SKP2 interagit avec les régions MBII et HLH-LZ de c-Myc. Cette ubiquitination est indépendante de la phosphorylation de Thr58 (S. Kim et al. 2003) (von der Lehr et al. 2003) (X.-X. Sun et al. 2021). Un autre membre de la famille SCF, la SCF^{Fbw7} est impliquée comme SKP2 dans la dégradation de c-Myc. Fbw7 cible la région MBI en se liant sur la Thr58 et Ser62 doublement phosphorylées (Figure 21), et peut en outre agir comme un suppresseur de tumeur. Ainsi la perte de Fbw7 augmente les niveaux de c-Myc stimulant la tumorigenèse. Contrairement à SCF^{Fbw7}, la SCF ^{β -TrCP} rehausse la stabilité de c-Myc par une polyubiquitination sur les lysines K33/K63/K48 de l'extrémité N-terminale. Sur le plan mécanique, β -TrCP favorise la formation de chaînes mixtes, contenant des liaisons d'ubiquitine K33/K63/K48 alors que les chaînes d'ubiquitine K48 promues par Fbw7 sont nécessaires à l'élimination de c-Myc par le protéasome. L'ubiquitination par la SCF ^{β -TrCP} a lieu préférentiellement en phase G2 du cycle et est nécessaire pour la capacité de c-Myc à faciliter la reprise du cycle après en arrêt en phase S. Le site de liaison de la SCF ^{β -TrCP} sur c-Myc est un résidu phosphorylé par la kinase Plk1, qui est plus active pendant les phases G2 et M (Popov et al. 2010) (X.-X. Sun et al. 2021).

Aujourd'hui au moins 18 ubiquitines ligases de c-Myc ont été découvertes, la plupart étant impliquées dans la dégradation de la protéine, et donc l'inhibition de son activité. Cependant certaines, comme on l'a vu pour la β -TrCP et la Skp2, favorisent les fonctions oncogéniques de c-Myc et constituent des cibles thérapeutiques prometteuses. Ainsi le ciblage de la Skp2 qui est surexprimée dans beaucoup de cancers, notamment les lymphomes non-hodgkiniens dont le lymphome de Burkitt (Chiarle et al. 2002) pourrait capitaliser la fonction pro-apoptotique de c-Myc (X.-X. Sun et al. 2021).



4.3. Sumoylation

La sumoylation, réaction ATP-dépendante, consiste en l'addition covalente réversible d'une ou plusieurs petites protéines modificatrices de type ubiquitine SUMO (small ubiquitin-like modifier). Elle se produit par des réactions séquentielles impliquant une enzyme hétérodimérique d'activation de SUMO, SAE1/SAE2 (E1), une enzyme unique de conjugaison de SUMO, Ubc9 (E2), et l'une des quelques SUMO ligases (E3). c-Myc constitue une protéine cible pour la SUMOylation et ce processus participerait à la régulation de la stabilité de la protéine en interaction avec le système de l'ubiquitination. En effet, récemment il a été montré que SENP1, une SUMO-protéase spécifique de c-Myc, produit la désumoylation de c-Myc et entraîne la répression de l'élimination de c-Myc par la voie du protéasome. Ainsi, SENP1 stabilise et augmente le niveau d'activité transcriptionnelle de c-Myc (X.-X. Sun et al. 2018). Cet effet pourrait être en partie dû à la déubiquitination indirecte de c-Myc, car c-Myc peut être co-modifié à la fois par des ubiquitines et SUMO. De plus, un rôle potentiel de la sumoylation dans la tumorigenèse induite par c-Myc a été suggéré. Plus exactement, une dérégulation du réseau de régulation de l'ubiquitination-SUMOylation de c-Myc peut contribuer à la tumorigenèse (Hoellein et al. 2014). De même, c-Myc peut induire la transcription d'un composant de SUMO E1, SAE1 (SUMO-activating enzyme subunit 1), par liaison directe aux séquences E-box situées à proximité de SAE1 (X.-X. Sun et al. 2021).

4.4. O-glycosylation

La Thréonine 58, fréquemment mutée dans les lymphomes de Burkitt, est une cible putative pour la phosphorylation (comme décrit précédemment), mais aussi pour la O-glycosylation qui consiste en l'ajout de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) par la O-linked N-acetyl-glucosamine transferase (OGT) (Itkonen et al. 2013) (D. H. Lee et al. 2020). Ces deux modifications post-traductionnelles contribuent à réguler la stabilité de c-Myc et seraient compétitives en fonction des conditions environnementales ou intrinsèques des cellules. Ainsi, une mutation ponctuelle T58A augmente la glycosylation de la Thr58. En privation sérique, la phosphorylation de Thr58 diminue, permettant une augmentation de sa O-glycosylation. En stimulation sérique, un effet inverse a été observé (Kamemura et al. 2002). L'inhibition de la O-glycosylation réduit c-Myc *in vitro* et *in vivo* dans le cancer du poumon. Par conséquent, la O-glycosylation de c-Myc est une modification post-traductionnelle importante qui stabilise la protéine c-Myc et favorise ainsi la tumorigenèse (Józwiak et al. 2014) (Taparra et al. 2019).



4.5. Acétylation

c-Myc peut interagir avec, et être acétylée par plusieurs enzymes histone acétyltransférase (HAT) *in vitro* et *in vivo* dont la GCN5 (General control of amino-acid synthesis 5), p300/CBP (CREB Binding Protein) et Tip60 (TAT-interactive protein 60). Il est intéressant de noter que ces modifications pourraient jouer un rôle dans la stabilisation de c-Myc et la dégradation de la protéine. L'acétylation de c-Myc entre en compétition avec l'ubiquitination de c-Myc. L'acétylation des lysines (K143, K157, K275, K317, K323, K371) par l'acétyltransférase p300/CBP est impliquée dans la dégradation de c-Myc (Faiola et al. 2005). Ceci contraste avec l'effet de l'acétylation par GCN5 et TIP60 qui stabilise et augmente significativement la demi-vie de c-Myc (J. H. Patel et al. 2004) (Mustachio et al. 2019). c-Myc interagit directement avec p300/CBP alors qu'elle nécessite la présence de TRRAP pour interagir avec GCN5 et TIP60.

En conclusion toutes ces modifications post-traductionnelles de c-Myc viennent encore complexifier les processus de régulation de cet oncogène. Cependant, étant pour la plupart au coeur de la stabilité de c-Myc, elles démontrent aussi le caractère dynamique du « turnover » de cet oncogène médié par la dégradation par le protéasome et les interrelations complexes entre les différentes régulations post-traductionnelles. Il en résulte un contrôle très étroit de son activité transcriptionnelle, soulevant l'importance de c-Myc dans les processus cellulaires et sa dérégulation dans les cancers (X.-X. Sun et al. 2021).

5. Dégradation de c-Myc

Finalement il faut aussi noter que la protéine Myc est rapidement détruite après sa synthèse, avec une demi-vie de 20 à 30 minutes (S R Hann and Eisenman 1984); cette dégradation rapide par protéolyse est une étape terminale dans un processus de régulations finement orchestré pour maintenir sous contrôle les taux cellulaires de Myc (Thomas and Tansey 2011). Il existe plusieurs mécanismes pour garantir une élimination adéquate de c-Myc : le clivage dépendant de la calpaïne et la dégradation par voie protéasomique.



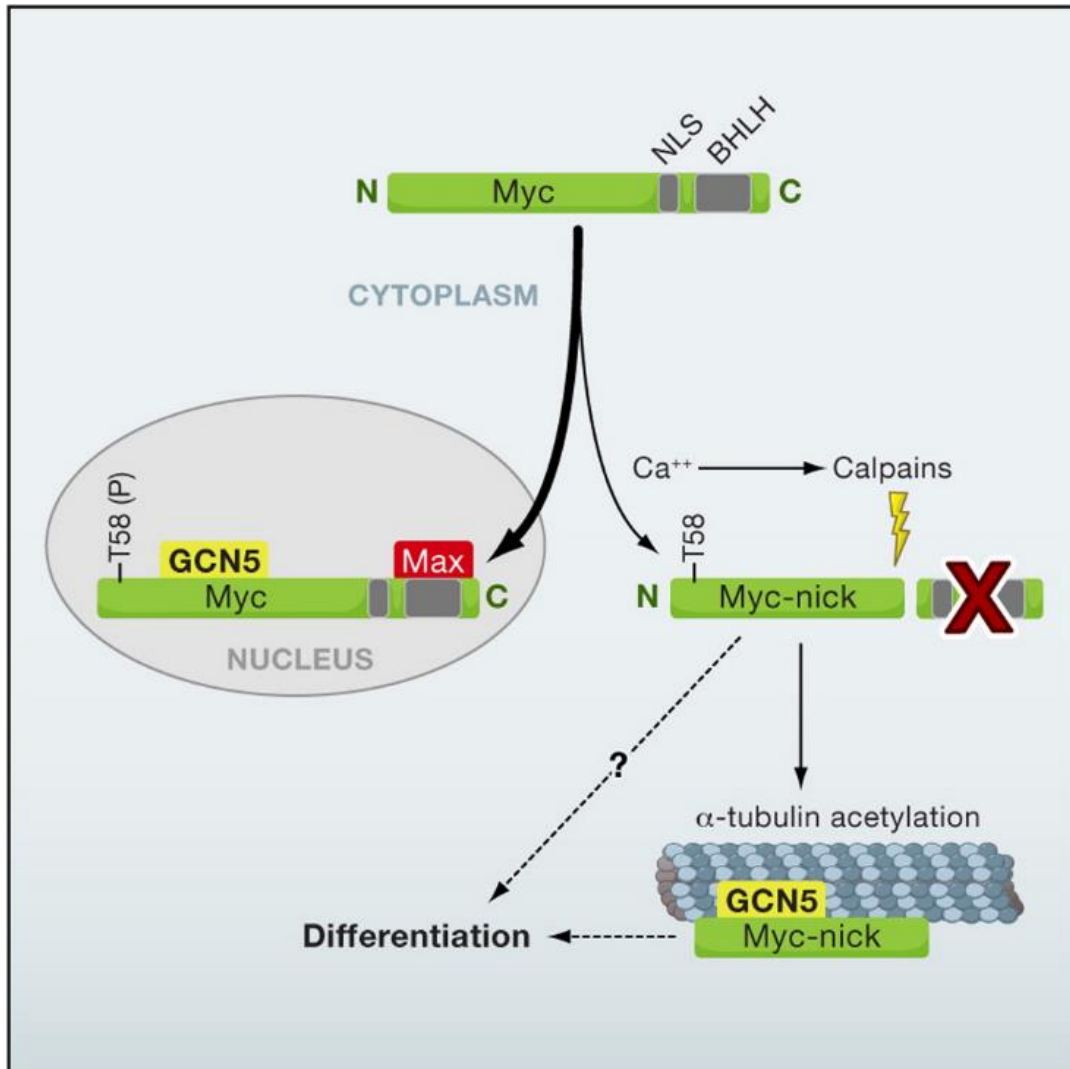


Figure 22: Myc-Nick, moteur de réorganisation et de différenciation cytoplasmique.

Myc-nick, une forme cytoplasmique de Myc formée de 298 acides aminées et produite par protéolyse partielle dépendante de la calpaïne à la lysine 298 de Myc pleine longueur. Produite sous conditions de stress, Myc-nick conserve la partie N-terminale acide contenant les régions de boîte Myc conservées mais a perdu le domaine de localisation nucléaire et le domaine b-HLH-LZ essentiel pour l'hétérodimérisation avec Max et la liaison à l'ADN. Myc-nick induit une acétylation de l' α -tubuline et une modification de la morphologie cellulaire en recrutant l'histone acétyltransférase GCN5 dans les microtubules(Conacci-Sorrell, Ngouenet, and Eisenman 2010).



5.1. Clivage dépendant de la calpaïne

Les calpaïnes sont des hétérodimères associées une sous-unité enzymatique responsable de protéolyse de certaines protéines et une sous-unité régulatrice, la calpaïne 4 (Capn4). Il s'agit d'une famille de protéases calcium-dépendantes dont leur activité protéolytique est induite par la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire. Cette réaction aura lieu dans le cytosol au contraire de la dégradation protéasomique qui aura lieu en principe dans le noyau. Small et collaborateurs ont montré dans une étude *in vivo*, une éventuelle participation de la calpaïne au clivage cytoplasmique au niveau de la lysine 298 de c-Myc montrant que la dégradation via le protéasome n'est pas la seule stratégie d'élimination de c-Myc (Small et al. 2002). Le clivage de c-Myc génère un fragment N-terminal de 298 aa appelé « Myc-nick ». Myc-nick est produit en excès dans des conditions telles que le stress cellulaire ou la privation de nutriments, et favorise la survie, assurant une résistance au traitement et aux facteurs de stress en induisant l'autophagie (Conacci-Sorrell et al. 2014). La surexpression ectopique de Myc-nick augmente la mobilité et la métastase cellulaire en induisant la formation de filopodes et la production de la fascine, une protéine responsable du maintien de l'actine en un faisceau rigide (Anderson et al. 2016). Par contre il est très important de mentionner que la dégradation de c-Myc par la calpaïne est partielle, elle élimine juste la partie C-terminale et le signal de localisation nucléaire (NLS) (Figure 22). De plus, des études montrent que Myc-nick joue un rôle dans la régulation des microtubules afin de favoriser la différenciation des cellules musculaires (Conacci-Sorrell, Ngouenet, and Eisenman 2010) (Farrell and Sears 2014).

5.2. Dégradation par la voie protéasomique

La dégradation du c-Myc est essentielle pour assurer une courte demi-vie de la protéine (20-30 mins). La voie de dégradation de c-Myc la plus importante est réalisée par le système UPS, un processus hautement spécifique et dépendant de l'ATP qui aura lieu dans le noyau ou/et dans le cytoplasme (Salghetti, Kim, and Tansey 1999) (Farrell and Sears 2014). Au cœur de ce système se trouvent les protéasomes, responsables de la dégradation ciblée, qui sont constitués du cœur catalytique 20S et des complexes régulateurs permettant l'entrée dans la chambre catalytique (11S et 19S). Le protéasome traditionnellement appelé 26S est composé de 20S et deux unités régulatrices 19S (Livneh et al. 2016). Le processus d'élimination de la protéine c-Myc se fait en deux étapes : (1) l'ajout des molécules d'ubiquitine de manière covalente à un résidu lysine 48 (K48) par l'ubiquitine ligase E3 (2) la dégradation de c-Myc



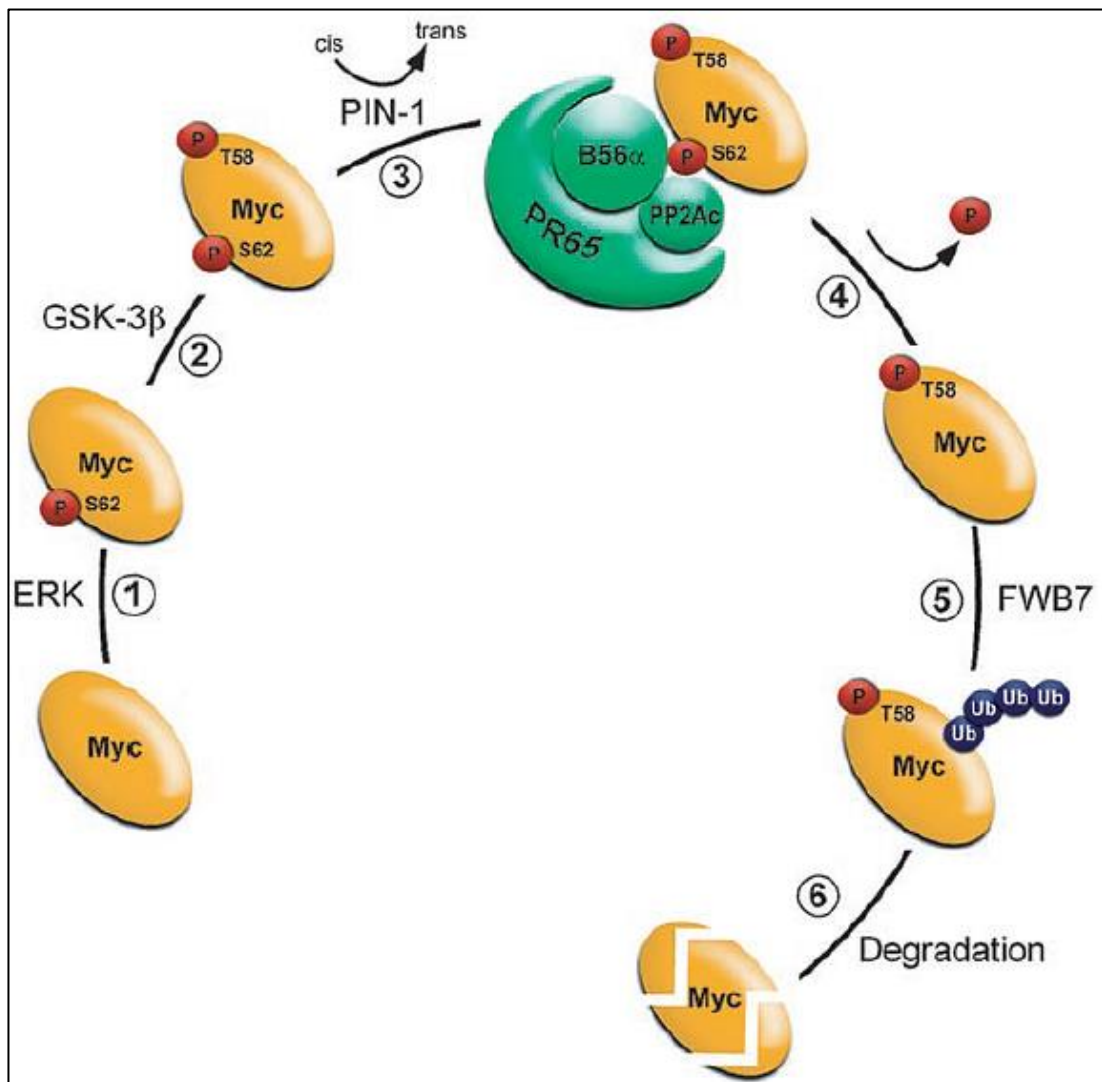


Figure 23: La demi-vie de c-Myc de la phosphorylation à la dégradation.

(1) La phosphorylation de la Ser62 résulte en une stabilisation de la protéine. (2) la phosphorylation de Ser62 (S62) favorise la phosphorylation de la Thr58 (T58) par GSK-3 β . (3) une modification de la conformation de c-Myc aura lieu : Cis \rightarrow Trans suite à la liaison de la propyl isomérase PIN1. (4) la conformation trans, expose la S62 phosphorylée à la phosphatase PP2Ac conduisant à la déphosphorylation de ce résidu. (5) c-Myc mono-phosphorylé sur Thr58 est une cible pour le complexe ubiquitine ligase contenant FWB7 (E3 ligase), ajoutant une chaîne poly-ubiquitine et (6) conduisant finalement à la dégradation protéosomale de c-Myc (Junttila and Westermarck 2008).



poly-ubiquitinylé par le protéasome 26S qui reconnaît la K48 poly-ubiquitinylée (Junttila and Westermarck 2008) (Figure 23). L'ajout de l'ubiquitine a déjà été détaillée précédemment, et est finalement effectuée par l'ubiquitine ligase E3. Cette étape nécessite une phosphorylation de la Ser62 (probablement médiée par la voie Ras-ERK) suivie, comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les phosphorylations de c-Myc, d'une déphosphorylation par un « échafaudage » impliquant GSK3- β , Pin1 et la PP2A facilitant la phosphorylation de la Thr58 par GSK3- β (R. C. Sears 2004) (Arnold et al. 2009). Ces réactions de phosphorylation et de déphosphorylation permettent la liaison de FBW7 (F-box & WD repeat domain –containing 7) au MBI, recrutant ainsi le complexe SCF^{FBW7} (Skp1-cullin-1-F-box complex) (Welcker et al. 2004). SCF^{FBW7} permet à son tour l'ubiquitination de c-Myc et la dégradation par le protéasome (Figure 23). Ainsi, les protéines y compris c-Myc présentent une séquence « signal » de dégradation nommée « degron », et plus précisément ici un « phospho-degron », qui est reconnue par les E3 ligases (Figure 21). Il n'est donc pas étonnant que des mutations qui touchent surtout la Thr58 (50% des lymphomes), située dans la partie N-terminale au niveau de la séquence « degron », améliorent profondément les propriétés tumorigènes de c-Myc *in vitro* et *in vivo* (Chakraborty et al. 2015).

Finalement, une étude récente montre un mécanisme d'accélération de la dégradation par le protéasome indépendant de l'ubiquitination de c-Myc ou de la phosphorylation de la Thr58 induit par une protéine régulatrice des polyamines, l'antizyme 2 (AZ2), dans des conditions spécifiques comme l'hypoxie et la privation de glucose. En effet, dans ces conditions de stress cellulaire, il y a une augmentation des taux de polyamines, ce qui induit l'AZ2 qui est transférée au noyau et interagit avec c-Myc ce qui permet une accélération de la dégradation par le protéasome (Murai et al. 2018).

III. c-Myc et lymphomes B

Le gène *c-MYC* a été identifié initialement chez l'homme dans le lymphome de Burkitt, un cancer des lymphocytes B, où il est impliqué dans la translocation t(8;14)(q24;q32) juxtaposant *c-MYC* en position 8q24.21 avec le locus *IGH* du chromosome 14, induisant sa surexpression (Dalla-Favera et al. 1982). Depuis, la dérégulation de *c-MYC* a été démontrée essentielle à la physiopathologie de beaucoup de lymphomes B, plus rarement des lymphomes T (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine c-Myc occupe un rôle central dans la vie des cellules, et c'est bien sûr aussi le cas pour



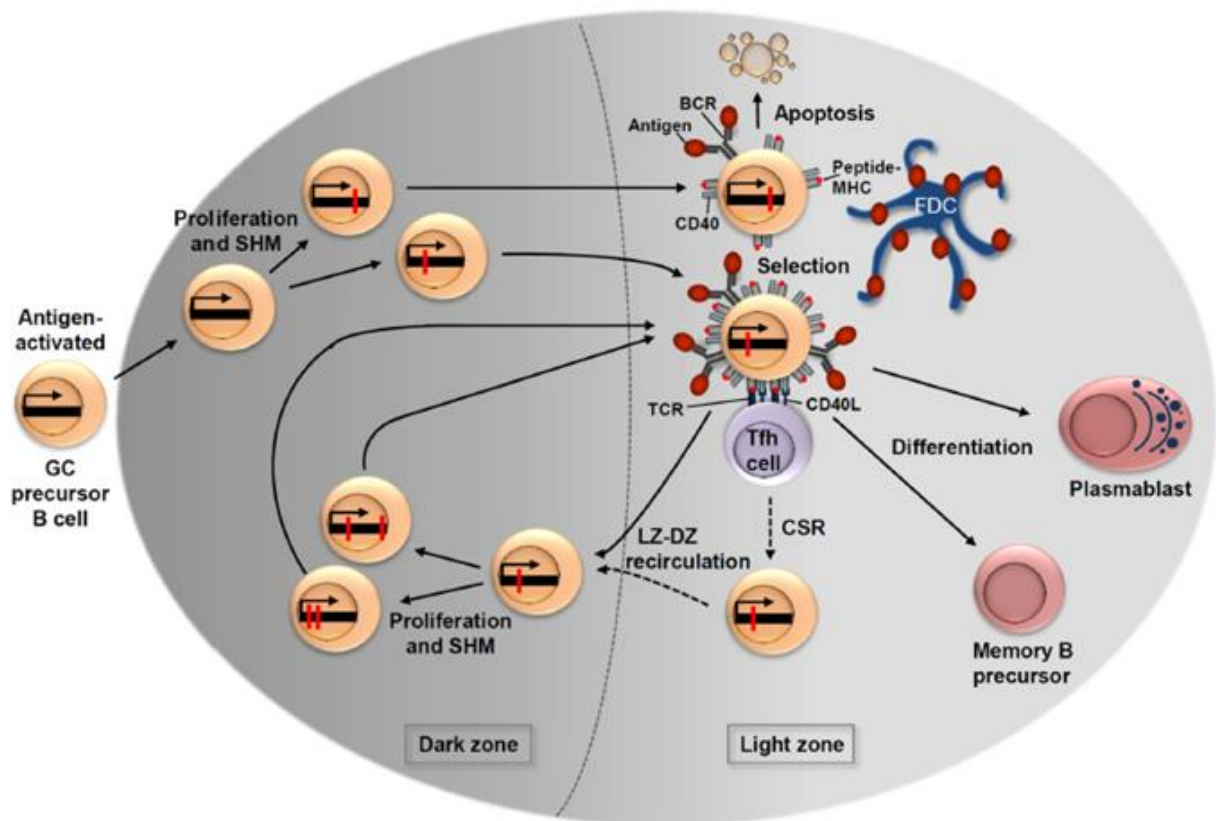


Figure 24: Activation des lymphocytes B et formation des centres germinatifs.

L'activation des lymphocytes B par l'Ag en présence de lymphocytes T auxiliaires (LTh) dans les organes lymphoïdes périphériques induit la formation des centres germinatifs (CG). Le centre germinatif mature se subdivise en zone sombre (DZ) et zone claire (LZ). La DZ est principalement formée de cellules B hautement prolifératives appelées centroblastes. Au cours de la prolifération massive, les cellules B centroblastes subissent une hypermutation somatique (SHM) dans les régions variables de leur récepteur BCR (traits rouges) afin d'augmenter leur affinité pour l'antigène (Ag). Dans la LZ, les cellules B devenues des centrocytes portant des BCR mutés et présentent leur BCR aux Tfh (Cellules auxiliaires folliculaires T) afin de tester l'affinité de liaison de leur BCR. En cas de sélection positive, les centrocytes survivent et subissent une commutation isotypique (CSR : Recombinaison de classe). Finalement, les cellules B présentant des affinités BCR plus faibles ou auto-actifs entrent dans un processus apoptotique (sélection négative). Les cellules B qui expriment un BCR qui a une affinité pour l'Ag sortent du CG vers le destin de cellule mémoire ou de plasmocyte (sélection positive). Un sous-ensemble de cellules B de la zone claire peut recirculer vers la zone sombre (LZ-DZ recirculation) où il subit une nouvelle prolifération et une nouvelle SHM, générant ainsi potentiellement des anticorps mutants avec une affinité améliorée (De Silva and Klein 2015).



les lymphocytes B où elle participe à la régulation de la vie, prolifération et maturation des lymphocytes B suite à leur activation, comme nous allons le détailler maintenant.

1. *c-Myc* et développement des lymphocytes B dans les centres germinatifs.

c-MYC est initialement exprimé dans les cellules B suite à leur activation par l'antigène (Ag) en présence de lymphocytes T, et est essentiel à la formation des centres germinatifs (CG) au sein des follicules lymphoïdes des organes lymphoïdes périphériques.

En effet, le lymphocyte B qui est la cellule à l'origine de la production des anticorps, en réponse à l'invasion des organismes notamment par des agents infectieux extracellulaires (réponse immunitaire adaptatrice humorale) doit d'abord se différencier en plasmocytes. Les cellules B immatures sont produites dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (précurseurs lymphoïdes) où elles subissent une série de maturations durant lesquelles survient en particulier le réarrangement des gènes des immunoglobulines, aboutissant notamment à l'expression de leur récepteur à l'Ag ou BCR (B-cell receptor) ; puis elles migrent vers les organes lymphoïdes périphériques où elles résident dans les follicules lymphoïdes primaires (lymphocytes B naifs). Suite à une stimulation antigénique au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B subissent alors une nouvelle série de modifications génétiques en même temps qu'une expansion clonale au sein de structures appelées CG dans les follicules qui grossissent et deviennent les follicules secondaires. Ainsi, les cellules B en prolifération ou centroblastes forment la zone sombre (DZ, Dark Zone) du centre germinatif et subissent la maturation d'affinité de leur BCR. Il s'agit d'un processus d'hypermutations somatiques qui est réalisé au niveau de la région variable des gènes des Ig (chaînes lourde et légère) dans un contexte T-dépendant par une enzyme nommée AID (Activation-induced cytidine deaminase) exprimée uniquement par les centroblastes (Muramatsu et al. 1999; 2000).

Ce processus terminé, les centroblastes arrêtent de proliférer et deviennent des centrocytes qui forment alors la zone claire (LZ, Light Zone) des CG. Les centrocytes subiront une dernière modification, la commutation de classe (switch isotypique) des immunoglobulines (vers les IgG, IgA, ou IgE de haute affinité) (Nelson 2010) (Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai 2020). Les cellules B qui auront acquis un BCR de faible affinité ou auto-actives seront éliminées par apoptose. Les lymphocytes B qui expriment un BCR de très haute affinité seront sélectionnés positivement via leur interaction avec des cellules folliculaires dendritiques (FDC) présentatrices d'Ag, survivent et poursuivent leur différenciation soit en cellules productrices d'anticorps (ou plasmocytes) soit en lymphocytes B mémoires (Figure 24). Les centrocytes ont la possibilité de retourner dans la zone sombre afin d'y subir un nouveau cycle de prolifération et d'SHM (Somatic Hypermutation) suivie d'une nouvelle sélection. Les lymphocytes B qui



n'ont pas été activés se retrouvent à la périphérie des centres germinatifs. En conséquence, chaque région ganglionnaire correspond un stade de différenciation de lymphocytes B (Küppers 2005) (De Silva and Klein 2015).

c-MYC est essentiel au développement B précoce dans la moelle osseuse en régulant la transcription de gènes déterminants dans le maintien de l'identité des cellules B (Vallespinós et al. 2011). De plus, il va jouer un rôle important lors de la formation des CG. En effet, il favorise la progression du cycle cellulaire comme on l'a vu en activant notamment les CDK et la cycline D2 (*CCND2*). Son expression est proportionnelle à l'augmentation de la taille des cellules du centre germinatif et le nombre d'expansions clonales en réponse à l'activation antigénique (Finkin et al. 2019). L'expression de *c-Myc* dans les cellules B naïves est très faible par rapport à celles des cellules B des CG. Le modèle d'expression de *c-Myc* est biphasique : il est d'abord exprimé précocément et de manière transitoire dans une petite proportion de cellules B activées en présence de cellules Th et d'Ag, puis il est réprimé par *Bcl6* (B-cell lymphoma 6) (décrit ci-dessous) dans les cellules hautement prolifératives de la DZ. En effet, *Bcl6* est considéré comme le « régulateur clef » de la formation du centre germinatif. C'est un répresseur transcriptionnel qui permet de réprimer un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire, dont *CDKN1A* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A) en interagissant avec *MIZ1*. Sa fonction principale est de réprimer ou de prévenir l'activation prématurée des cellules des CG en réprimant les membres de la signalisation BCR/CD40 (Cluster of Differentiation 40) et des gènes de différenciation tels que *PRDM1/Blimp-1* et en modulant les réponses aux chimiokines et aux cytokines (Factor 4 interferon regulator, IRF-4) (Basso and Dalla-Favera 2010). Il est important de noter que *Bcl6* inhibe également la réponse aux dommages de l'ADN en inhibant l'expression de *p53*, empêchant l'apoptose due aux dommages de l'ADN, ce qui va favoriser la survenue des évènements d'hypermutations somatiques. Ainsi, dans la zone sombre, la prolifération importante des centroblastes en réponse à des antigènes se produit de façon paradoxale en l'absence d'expression de *c-Myc*. Ces cellules expriment le facteur de transcription TCF3 (Facteur de transcription 3 ou E2A) qui active l'expression du gène *CCND3*, codant la cycline D3, et le facteur de transcription E2F2 qui contrôlent le cycle cellulaire. Cela paraît normal car *c-Myc* régule négativement la libération de la pause transcriptionnelle de l'ARN polymérase II, qui est essentielle pour l'hypermutation somatique caractéristique des cellules du DZ (Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017). Bien que *Bcl6* est nécessaire pour la formation du CG, l'activation des récepteurs tels que BCR, CD40 et le facteur IRF4 et des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation vont réprimer ensuite *Bcl6* atténuant la répression du promoteur *c-MYC*. Ainsi, dans la zone claire, la voie NF- κ B est activée dans



les cellules B $c\text{-MYC}^+$, activant davantage l'expression de $c\text{-MYC}$. Ce dernier induit l'expression du gène $CCND2$, codant la cycline D2, entraînant une prolifération $CCND2$ -dépendante. Il est intéressant de noter que l'expression de $c\text{-MYC}$ d'un sous-ensemble de cellules B, induite par la stimulation réalisée via les cellules Tfh (T follicular helper cells) dans la zone claire, permet leur réintégration dans la zone sombre pour des cycles supplémentaires (Cai et al. 2015) (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017). Les cellules subissent alors une nouvelle prolifération et une nouvelle hypermutation somatique générant des clones B ayant une haute affinité de leurs BCR. Les cellules B de la LZ qui n'expriment pas $c\text{-Myc}$ deviennent des cellules mémoire ou des plasmocytes. La différenciation des centrocytes en plasmocytes ou cellules mémoire nécessitent la répression de $BCL6$ et de $c\text{-MYC}$ afin de maintenir un état de différenciation terminale et de non-prolifération. Cette fonction est accomplie par BLIMP-1 qui est un répresseur transcriptionnel qui favorise la différenciation cellulaire et d'autres fonctions essentielles des plasmocytes comme la migration et l'adhésion (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017) (Korać et al. 2017).

Ainsi, les événements d'hypermutations somatiques et de remaniements géniques se produisant au cours de l'activation des lymphocytes B génèrent des cassures de l'ADN et la mise en jeu de processus de réparations de l'ADN, sources d'anomalies génétiques (amplifications, translocations, mutations abérantes...) pouvant conduire à tout moment à un lymphome. Dans le cadre de notre thèse nous avons choisi d'étudier le rôle de $c\text{-Myc}$ et plus précisément des variants transcriptionnels et traductionnels de $c\text{-MYC}$ dans les lymphomes B.

2. $c\text{-Myc}$ et lymphomes B chez l'homme

2.1. Généralités sur les lymphomes

La très grande majorité des lymphomes sont des cancers des lymphocytes B et parmi eux, la plus grande variété compose le groupe des lymphomes B non Hodgkinien (B-NHL). Selon des statistiques récentes, les B-NHL touchent 544.000 personnes dans le monde et ont été à l'origine de la mort de 260.000 personnes en 2020, en ajoutant 83.000 nouveaux cas et 23.000 décès dues au lymphome Hodgkinien (Sung et al. 2021). L'Europe compte parmi les pays qui ont enregistré un nombre d'incidences élevé. Le lymphome B est une tumeur qui touche les lymphocytes B du système immunitaire aux différents stades du développement des cellules B



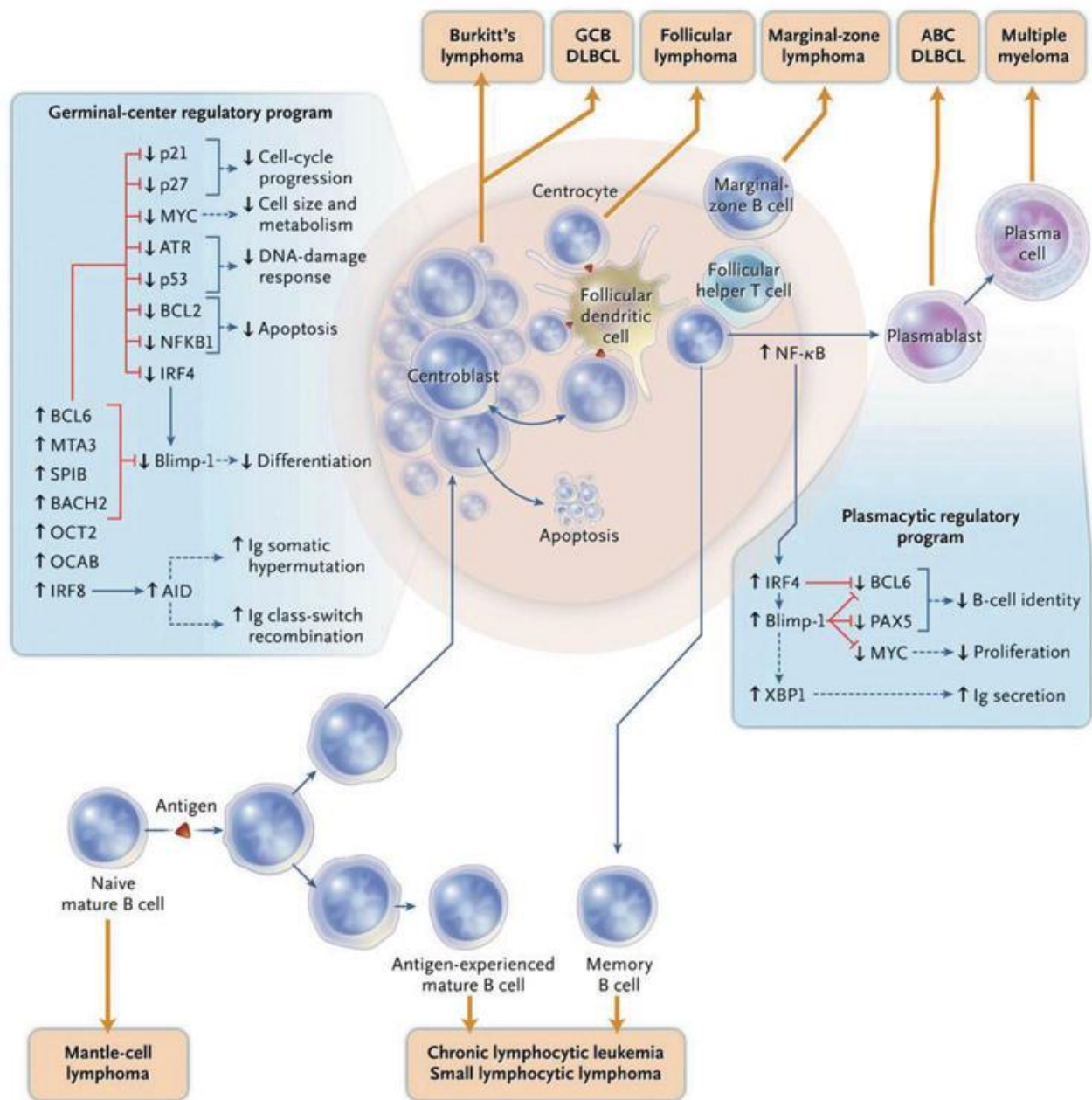


Figure 25: Représentation schématique des lymphomes survenant à différents stades de la différenciation des cellules B.

La plupart des types de lymphomes B sont dérivés du centre germinatif où les cellules sont bloquées à différents stades de maturation. Les événements génétiques se produisant dans les CG (SHM et CSR) augmente les risques de développement des lymphomes. Les cellules du lymphome folliculaire, de Burkitt et GCB-DLBCL ressemblent à des cellules de la zone sombre. Tandis que les cellules du lymphome de la zone marginale, ABC-DLBCL, myélome multiple, leucémie lymphocytaire chronique/petit lymphocyte, sont dérivées des cellules d'origine post-CG (de cellules B à mémoire et de plasmocytes. Les lymphomes du manteau sont issus des cellules B matures naïves. ABC-DLBCL, activated B-cell-DLBCL; BL, Burkitt lymphoma; DLBCL, GC B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma; BCL6, B-cell lymphoma 6 (Škunca 2019).



et la plupart dérivent d'une cellule B qui réalise ou a réalisé sa maturation dans un CG (Figure 25).

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO) est la référence : certains lymphomes sont dits indolents ou de bas grade, à évolution lente (dont le lymphome folliculaire par exemple) et les lymphomes agressifs ou de haut grade (comme le lymphome de Burkitt et le lymphome diffus à grandes cellules B ou DLBCL) sont des cancers à évolution rapide (Scheller et al. 2010) (Swerdlow et al. 2016) (Mlynarczyk, Fontán, and Melnick 2019).

2.2. Altérations de c-Myc dans les lymphomes B non-Hodgkiniens

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent l'expression de c-Myc et donc son taux sont finement régulés dans la cellule au niveau transcriptionnel comme traductionnel, assurant dans les conditions normales une expression plutôt faible et, dans tous les cas, transitoire. Des dérégulations peuvent à tout moment se produire et il est facile de comprendre l'avantage en terme de survie, de prolifération et de métabolisme qu'aura une cellule qui va surexprimer cet oncogène. Un certain nombre de tumeurs semblent ainsi devenir « dépendantes » de l'expression et l'activité de c-Myc dans lesquelles l'inhibition ou l'atténuation de c-Myc reverse la tumorigenèse et conduit à l'apoptose ou la régression tumorale (von Eyss and Eilers 2011). Contrairement à ses homologues oncogènes qui acquièrent un potentiel transformateur via des mutations ponctuelles (exemple : *EGFR*, *RAS*, etc.), *c-MYC* définit son potentiel oncogénique via des amplifications (amplification du nombre de copies dans le génome), des translocations et des dérégulations (perturbations des mécanismes de régulation de c-Myc). L'amplification de c-Myc est ainsi détectée dans des tumeurs hématopoïétiques ou non-hématopoïétiques, y compris les cancers solides comme du poumon, du sein et du colon (Alitalo et al. 1983) (Castell and Larsson 2015) (Wolfer et al. 2010) (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017) (Zhang et al. 2019) (A. S. Patel et al. 2020). Dans les cancers hématologiques, des dérégulations impliquant *c-MYC* sont presque toujours retrouvées dans les B-NHL avec des mécanismes parfois différents d'un lymphome à l'autre. Dans la plupart des cas la surexpression de c-Myc n'est pas suffisante pour expliquer le développement du lymphome et correspond plutôt à un évènement secondaire. Cependant, dans le cas du lymphome de Burkitt les translocations impliquant *c-MYC* sont détectées dans plus de 90% des cas, avec une surexpression consécutive de c-Myc au niveau du noyau, et constituent l'évènement primaire de la pathogénicité de ce lymphome (Klapproth and Wirth 2010)(Ott, Rosenwald, and Campo



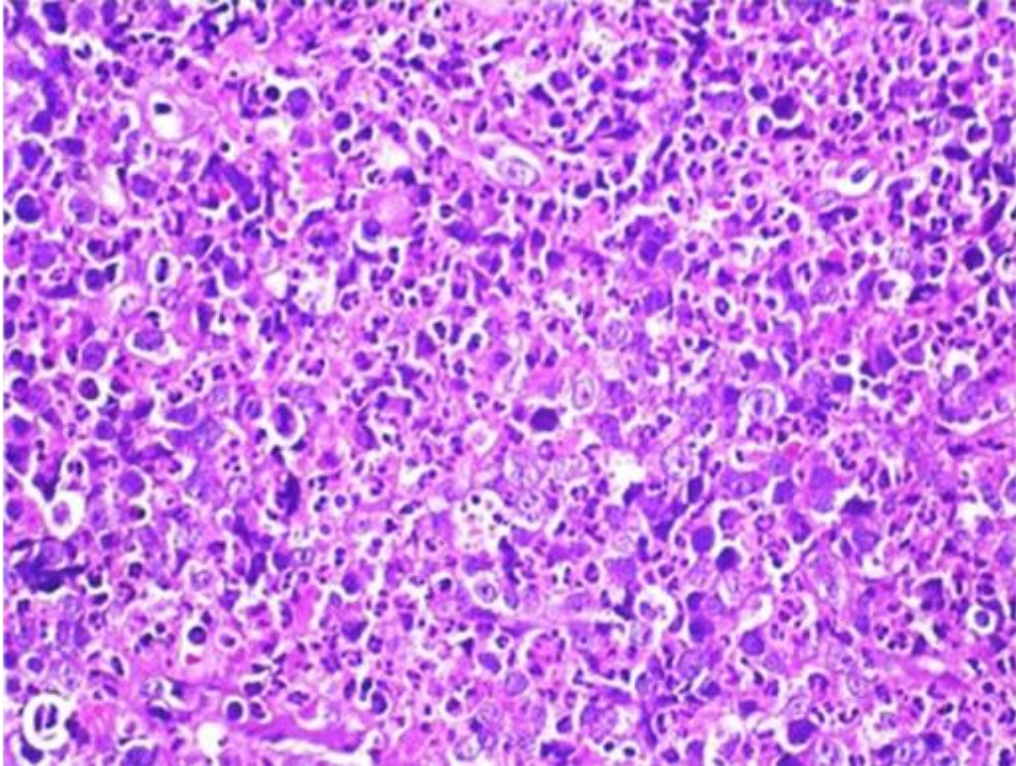


Figure 26: Coupe histologique du lymphome de Burkitt sporadique.

Représentation d'une coupe histologique du lymphome de Burkitt sporadique marquée avec de l'hématoxyline et de l'éosine (40X) illustrant l'aspect des cellules tumorales avec un ou plusieurs nucléoles, et les macrophages avec des corps apoptotiques donnant l'apparence d'un « ciel étoilé ». (Pedraza et al. 2019).



2013) (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017). C'est pourquoi nous avons choisi d'illustrer en premier le rôle de c-Myc dans les lymphomes de Burkitt.

3. Cas du lymphome de Burkitt

3.1. Présentation générale du lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (BL) est une prolifération B monoclonale qui a été décrite par Denis Burkitt en 1958. Il représente 1 à 5 % de tous les B-NHL (Linch 2012). Il s'agit d'un lymphome non-Hodgkinien, à cellules B matures de phénotype CG présentant un haut pouvoir prolifératif.

Selon l'OMS, il existe trois formes cliniques du lymphome de Burkitt de malignité différente: une forme endémique, une forme sporadique, et un lymphome de Burkitt associé à une immunodéficience (Brady, MacArthur, and Farrell 2008) (Graham and Lynch 2021). La forme endémique, retrouvée surtout en Afrique centrale, est liée à la malaria et à une infection virale par l'EBV (98%) et touche essentiellement les enfants (4-7 ans). Cliniquement, les malades développent des tumeurs au niveau des mâchoires, ou de la cavité abdominale (ovaires, tractus gastro-intestinal, reins, foie...). La forme sporadique localisée au nord de l'Amérique et en Europe présente les mêmes caractéristiques morphologiques que les Burkitt endémiques mais elle est plus rare et indépendante des zones géographiques. Elle touche aussi plus les enfants que les adultes. Une des différences remarquables entre les deux formes est la fréquence avec laquelle l'EBV est présent : seulement 10-15% des lymphomes non-endémiques sont associées à l'infection d'EBV. Cliniquement, les patients présentent des tumeurs abdominales. Enfin les formes associées à une immunodéficience sont observées chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour la grande majorité des cas, et à un degré moindre aux transplantations d'organes (Graham and Lynch 2021) (Crombie and LaCasce 2021).

Sur le plan histopathologique, le lymphome de Burkitt est caractérisé par la présence des cellules de taille variable mais avec un aspect similaire caractérisé par un noyau de forme ronde ou ovale, avec plusieurs petits nucléoles. Le cytoplasme est basophile. Ces cellules ont un index prolifératif élevé. La présence de nombreux macrophages contenant des débris cellulaires issus de la phagocytose des cellules apoptotiques donne un aspect « ciel étoilé » à la coupe histologique de lymphome de Burkitt (Figure 26) (Pedraza et al. 2019).



Sur le plan phénotypique, les cellules B malignes expriment l'IgM membranaire et des marqueurs B comme le CD19, CD20, CD79a et PAX5. Elles sont aussi positives pour les marqueurs des CG comme CD10 et Bcl6 mais sont négatives pour Bcl2 (Graham and Lynch 2021).

3.2. Les traitements du lymphome de Burkitt

Comme nous l'avons indiqué, le lymphome de Burkitt représente une hétérogénéité de présentations cliniques qui impose des protocoles de traitement adaptés à chaque type de lymphome et en fonction de l'âge des patients. C'est un lymphome très agressif dont la réponse aux approches thérapeutiques semble être variable. Le traitement est généralement lourd, mais il permet actuellement d'obtenir un taux de guérison compris entre 80 et 90 %. Sans traitement, la maladie est rapidement mortelle.

La polychimiothérapie est le traitement de référence pour les BL, indépendamment de stade du cancer, malgré sa toxicité et le développement d'une résistance à long terme. Cependant la nature des drogues, la durée du traitement et le nombre de cures varient en fonction des patients, notamment en lien avec leur âge.

Le traitement initial était constitué de faibles doses de stéroïdes et de chimiothérapie avec typiquement du cyclophosphamide (CPM) et de la prednisone pour réduire le risque de syndrome de lyse tumorale (Tumor lysis syndrome, TLS). En effet, les régimes thérapeutiques traditionnels et actuels produisent des effets secondaires graves fréquents incluant une neutropénie, une myélosuppression sévère, de la fièvre et le TLS, qui désigne l'ensemble des complications métaboliques provoquées par la destruction massive des cellules tumorales, souvent accompagnées par une insuffisance rénale aiguë. Des doses intensifiées de méthotrexate et/ou de cytarabine sont administrées aux patients afin de limiter la vitesse de propagation de la maladie dans le système nerveux central (CNS). Cette prophylaxie du CNS est réalisée par injection intrathécale. La toxicité était souvent sévère et de nombreux adultes n'ont pas pu terminer toutes les phases de traitement, principalement en raison d'une dose élevée du méthotrexate. Dans cette optique, des modifications de la dose des molécules chimiothérapeutiques utilisées ont été suggérées. L'évaluation d'une stratégie qui réduit les doses du CPM, de la cytarabine et de la méthotrexate ont permis d'atteindre une toxicité faible et une survie à 2 ans de 71 % (Dunleavy 2018) (Saleh et al. 2020). Le groupe d'étude multicentrique Allemand sur la leucémie lymphoblastique aiguë de l'adulte (GMALL) a mis au point plusieurs protocoles spécifiques pour le traitement des BL en se basant sur les protocoles pédiatriques BFM (Berlin-Frankfurt-Munich protocol). Il s'agit d'un traitement de pré-phase de CPM et de prednisone, suivi de 6 cycles de chimiothérapie contenant de l'ifosfamide, étoposide, vincristine, cytarabine, méthotrexate à



haute dose, dexaméthasone et doxorubicine, ainsi qu'une trithérapie intrathécale de cytarabine, méthotrexate et dexaméthasone. Le taux de survie à 5 ans était significativement différent entre les groupes d'âge de moins de 25 ans, de 26 à 55 ans et de plus de 55 ans (90 % vs 84 % vs 62 % respectivement) (Saleh et al. 2020). Une approche différente de la programmation intensive, utilisant une exposition prolongée mais à faibles concentrations d'agents chimiothérapeutiques, a permis d'obtenir des résultats améliorés avec notamment une plus faible toxicité. C'est le cas du régime EPOCH (étoposide, prednisone vincristine, CPM, doxorubicine) utilisé aussi pour les DLBCL en rechute (Major and Smith 2021). Des modifications de doses qui prennent en compte l'état des patients, le nombre de neutrophiles et d'autres complications ont démontré des résultats efficaces.

Cependant, des améliorations majeures ont été apportées à la chimiothérapie combinée intensive, avec notamment l'utilisation de traitements moins intensifs et ciblés comme le rituximab (anti-CD20) seul ou associé (R-CHOP) à la polychimiothérapie CHOP, traitements déjà en place pour d'autres types de lymphomes non-hodgkiniens. Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le récepteur CD20, marqueur spécifique des lymphocytes B exprimé par la majorité des lymphomes (89% des cas du BL) (Kelemen et al. 2010). Différents modes d'action du rituximab ont été confirmés dont une cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC), une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), un arrêt du cycle cellulaire et une induction directe de l'apoptose (M. R. Smith 2003) (Weiner 2010). L'ajout du rituximab à la chimiothérapie intensive a été évalué dans plusieurs études qui démontrent qu'il s'agit d'une combinaison tolérable et améliorative des résultats avec un taux de survie à 2-4 ans de 77-89% (Dunleavy 2018) (Zhu et al. 2018) (Della Rocca et al. 2021). Ces nouveaux régimes visent à une toxicité atténuée des organes non-tumoraux (toujours incontournable) et tendent à améliorer le taux et les conditions de survie. Une augmentation spectaculaire du taux de survie (EFS, Event free survival) est en effet observé au cours des dernières décennies (Ribrag et al. 2016) (Dunleavy 2018) (Zayac and Olszewski 2020) (Saleh et al. 2020) (Della Rocca et al. 2021).

Dans l'ensemble, malgré un taux assez élevé de taux de guérison (entre 80 et 90%) mais au prix de traitements difficiles et lourds, il existe un potentiel pour de nouveaux traitements thérapeutiques, notamment pour diminuer leur toxicité. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la biologie des lymphomes de Burkitt, en particulier en cas de rechute et de résistance, afin d'identifier des thérapies qui amélioreront la survie des patients ne répondant pas aux régimes standards. Ainsi, des thérapies ciblées non encore évaluées dans le BL pourraient représenter de nouvelles alternatives thérapeutiques comme les inhibiteurs des ADN méthyltransférases (Gravina et al. 2010), les inhibiteurs des histone désacétylases (Ferreira et al. 2014; 2016), les oligonucléotides antisens ciblant c-Myc, les inhibiteurs de kinase cycline-dépendantes (ex : Inhibiteurs de CDK6), les inhibiteurs de



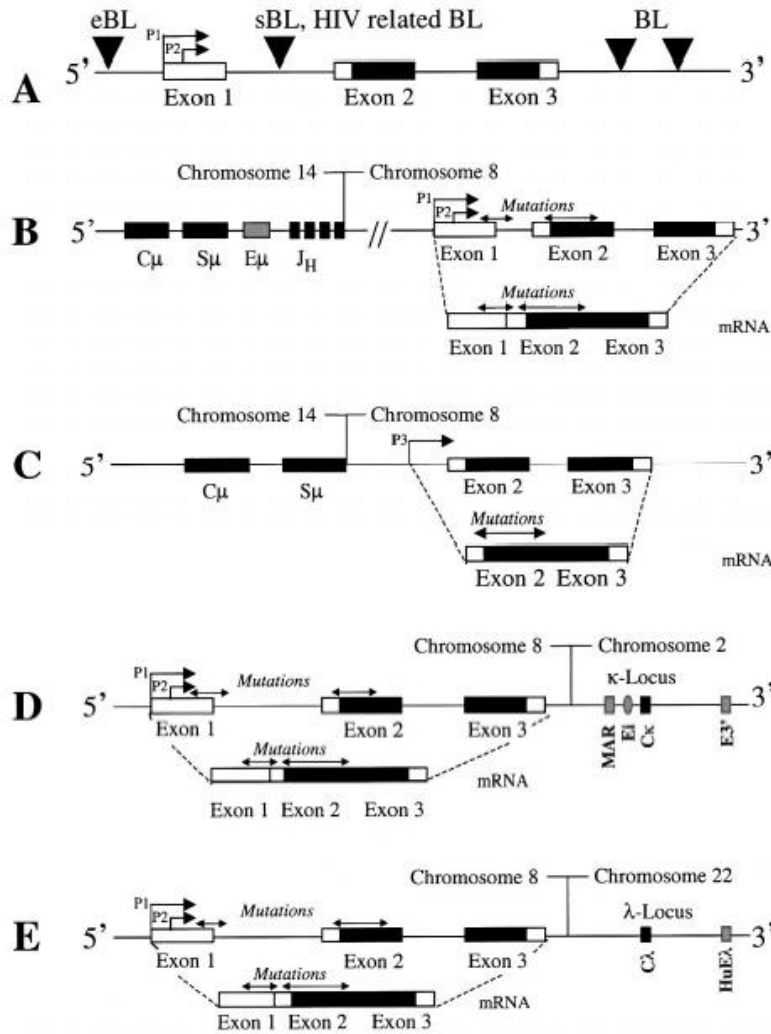


Figure 27: Positions des points de la cassure c-MYC/Ig et les types de translocations réciproques dans le lymphome de Burkitt.

- (A) La position du point de cassure situé dans la région 5' de l'exon 1 caractérise la forme endémique (eBL). La forme sporadique (sBL) et HIV-related BL sont caractérisées, le plus souvent, par une cassure localisée dans l'exon 1 ou l'intron 1 qui permet d'éliminer l'exon 1 et les 2 promoteurs P1 et P2. Le point de cassure de c-MYC peut également se produire dans la région 3'.
- (B) Un exemple typique de la t(8;14), souvent retrouvée dans la forme endémique, dans laquelle les séquences codantes de la région constante (C μ), Switch (S μ), et enhancer (E μ) sont juxtaposées avec c-MYC. La transcription est pilotée par P1 et P2. Les mutations les plus fréquentes touchent les régions négativement régulatrices.
- (C) Une exemple de t(8;14) typique de la forme sporadique dans laquelle la juxtaposition d'éléments amplificateurs 3' d'IgH et de séquences intron 1 de c-MYC aura lieu lors d'une tentative de changement d'Ig. Cette translocation élimine l'exon 1 et les 2 promoteurs P1 et P2. Alors la transcription de c-MYC est conduite par P3.
- (D) et (E) Les ruptures dans le chromosome 8 se produisent dans la région 3' de c-MYC, qui sont juxtaposées avec des séquences provenant soit du chromosome 2 (Ig κ), soit du chromosome 22 (Ig λ). La transcription à partir du P1 et P2 est activée par les enhancers E3' (D) et HuE λ (E). Les mutations auront lieu fréquemment dans les régions régulatrices négatives de l'exon 1 et de l'exon 2 de c-MYC (Hecht and Aster 2000).



PI3K et d'HSP90 (heat-shock protein 90) (Blum, Lozanski, and Byrd 2004). De même, la thérapie « anti-CD19 CAR-T cells » représente une autre alternative intéressante à envisager dans les lymphomes de Burkitt réfractaires (Dunleavy 2018) (Zayac and Olszewski 2020). Finalement, comme nous avons abordé dans la partie II (régulation de *c-Myc*), la régulation complexe de *c-MYC* offre plusieurs cibles thérapeutiques qui pourraient être à la base de nouveaux traitements pour les patients atteints de lymphome de Burkitt.

3.3. Altérations de *c-MYC* dans le lymphome de Burkitt

3.3.1. Translocations de *c-MYC*

Comme évoqué, la caractéristique génétique majeure de ce lymphome très agressif est la présence de réarrangements chromosomiques de l'oncogène *c-MYC* avec le locus des gènes codant les chaînes d'immunoglobuline (lourdes ou légères) : t(8;14), t(8;22) et t(2;8). Ces translocations sont induites suite à l'intervention de l'AID au cours des événements génétiques accompagnant l'activation des cellules B dans les CG (Dorsett et al. 2007). Ces translocations aboutissent à des dérégulations sévères des promoteurs de *c-MYC* ; en effet, les régulateurs positifs des gènes des Ig activés de façon permanente (amplificateurs ou enhancers, régions LCRs (Locus Control Region) et régions MARs) empêchent l'inhibition normale de *c-MYC* transloqué et l'active au contraire de façon constitutive (Charlotte A. Spencer and Groudine 1991) (Erikson et al. 1983) (Wierstra and Alves 2008).

La translocation réciproque t(8;14)/*MYC-IGH* est la plus fréquente (80-85% de tous les cas), elle implique le gène *c-MYC* localisé sur le bras court « q » du chromosome 8 et le locus de la chaîne lourde *IgH*, situé sur le chromosome 14 (Figure 27).

Cela juxtapose *c-MYC* au promoteur des gènes codant la chaîne lourde des Ig, ce qui aboutit à une expression constitutive de *c-MYC*. Alors que dans les translocations dites variantes moins fréquentes, *c-MYC* reste sur le chromosome 8, tandis que des parties de l'un ou l'autre des chromosomes 2 pour le locus *Igκ* -t(2;8)/*KAPPA-MYC*- (80% des cas) ou 22 pour le locus *Igλ* - t(8;22)/*MYC-LAMBDA*- (10% des cas) se juxtaposent à une distance variable en 3' de *c-MYC* (Taub et al. 1982) (Joos et al. 1992) (Molyneux et al. 2012) (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017).

Dans le lymphome de Burkitt, 3 principaux points de cassure de la translocation ont été décrits : à l'intérieur du gène *c-MYC* entre l'exon 1 et le premier intron (classe I), immédiatement en 5' à quelques kilobases de l'exon 1 (classe II) ou de façon plus éloignée de *c-MYC* de plus de 100 kb (classe III) (L. Nguyen, Papenhausen, and Shao 2017). Dans les formes endémiques, le point de cassure est fréquemment situé dans la région 5' de l'exon 1 de *c-MYC* et à 100 kb (Pelicci et



al. 1986). Dans ce cas le gène *c-MYC* est intact. Dans les formes sporadiques, le plus souvent le point de cassure est localisé dans l'exon 1 ou l'intron 1 du gène ce qui élimine l'exon 1 avec les promoteurs P1 et P2. Dans ce cas la transcription démarre au P3 ou au niveau de promoteurs présents dans des sites cryptiques de l'intron 1 (Wierstra and Alves 2008). Concernant les gènes des Ig, le point de cassure se produit généralement dans la région VDJ pour les formes endémiques, alors qu'il est retrouvé plus communément dans la région « Switch » (de recombinaison de classe) pour les formes sporadiques. Dans les formes liées à une immunodéficiência HIV, la translocation se produit aussi au niveau de la région « Switch » (Magrath 1990) (Boxer and Dang 2001) (Figure 27).

Ces translocations marquent un événement initial de la transformation maligne d'une cellule B normale et affectent plusieurs fonctions ou régulations de *c-Myc* servant la tumorigenèse : (i) une modification structurelle du gène *c-MYC* à la première frontière exon/intron qui place *c-MYC* à proximité relative du gène des Ig (200-700 kb) sous le contrôle transcriptionnel fort des amplificateurs (enhancers) des gènes d'Ig ; (ii) un shift de promoteur P2/P1 dans les cellules cancéreuses : le promoteur P1 devient le site préférentiel d'initiation de la transcription alors que P2 est un promoteur mineur (10%) (Strobl and Eick 1992) (Strobl et al. 1993) (Hu et al. 2007) ; (iii) une absence de blocage de l'allongement de l'ARNm.

Ainsi, dans le lymphome de Burkitt, l'activation de la transcription de *c-Myc* se fait préférentiellement à partir du promoteur P1 de *c-MYC* et est accomplie par des éléments amplificateurs des gènes des Ig juxtaposés. L'allèle normal de *c-MYC* est habituellement rendu « silencieux » au niveau transcriptionnel, et par conséquent seule la protéine *c-Myc* produite à partir de l'allèle transloqué est retrouvée exprimée dans les cellules de lymphome de Burkitt (Boxer and Dang 2001).

Lors de la translocation t(8;22), *c-MYC* est sous le contrôle de la région régulatrice de la chaîne légère *Igλ*. Un fragment englobant l'enhancer HuE d'*Igλ* augmente la transcription de *c-MYC* à partir de P1.

Dans la translocation t(2;8) les amplificateurs κEi (κ intron enhancer) et κE3' (κ 3' enhancer) peuvent induire l'activité des promoteurs P1 et P2, tandis que la région d'attachement à la matrice (MAR) permet une activation maximale du promoteur de *c-MYC* (Figure 27). Si les promoteurs P1 et P2 sont présents, le blocage du processus d'élongation transcriptionnel est perdu, et on observe un shift caractéristique de P2 vers P1. L'activation de P1 et de P2 est augmentée par l'interaction directe de deux facteurs de transactivation de *c-MYC*, Sp1 et FOXM1c (Forkhead/winged helix transcription factor) qui apportent aussi une synergie dans l'activation des promoteurs. FOXM1c se lie comme Sp1 au niveau de la boîte TATA de P1



comme de celle de P2, mais Sp1 présente une plus forte affinité aux sites de liaisons sur P1 déterminant une forte transactivation de ce promoteur (Geltinger, Hörtnagel, and Polack 1996). Cette très forte activation transcriptionnelle et constitutive de *c-MYC* est une étape déterminante de la pathogénicité du Burkitt car cela force les lymphocytes B à proliférer et les maintient dans un état indifférencié qui, lors d'un second évènement (mutation ou dérégulation), les poussera définitivement vers des cellules malignes (Wierstra and Alves 2008a). De même, lors de la translocation t(8,14), la région transloquée du locus *IGH* (région régulatrice 3'Ca) contient quatre sites hypersensibles à la DNase (HS1234-DNase I-Hypersensitive sites) qui fonctionnent comme un amplificateur LCR (Locus control region). Ces sites ont été signalés comme contribuant au shift du promoteur P2 vers P1 de *c-MYC*. Dans l'allèle transloqué, la transactivation de P1 par HS1234 est renforcée par l'interaction d'autres protéines (NF-κB, MAZ-R, NM23-H2...) avec les sites de liaison situés dans la région de P1 (Boxer and Dang 2001) (Wierstra and Alves 2006; 2008).

Cependant, l'étude faite par Müller montrent que des cellules B porteuses de translocations chromosomiques impliquant les loci d'*Ig* peuvent être trouvées à une basse fréquence (2% de *IGH/c-MYC*) chez des individus infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Müller et al. 1995). Chez les souris saines des translocations se produisent avec une fréquence de l'ordre de 1 sur 10⁶ cellules (Roschke et al. 1997). Les translocations impliquant les loci d'*Ig* sont associées à des processus normaux de la différenciation des cellules B et ne sont pas suffisantes dans la plupart des cas pour la tumorigenèse, mais elles constituent un évènement avantageux. En revanche, d'autres évènements se produisent pour aboutir à un lymphome comme par exemple l'échappement aux mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, le contournement de la surveillance du système immunitaire, etc... Ces évènements sont aussi communs à plusieurs types de cancers.

3.3.2. Mutations de *c-MYC* et d'autres gènes impliqués dans la lymphogénèse

En plus des translocations, de nombreuses mutations de *c-MYC* sont retrouvées dans environ 60% des lymphomes de Burkitt (Bhatia et al. 1993) (Giulino-Roth et al. 2012). Ces mutations touchent des domaines fonctionnels de la protéine qui augmentent sa fonction oncogénique, et par conséquent s'ajoutent à l'effet des translocations vues précédemment sur la surexpression de l'oncogène.



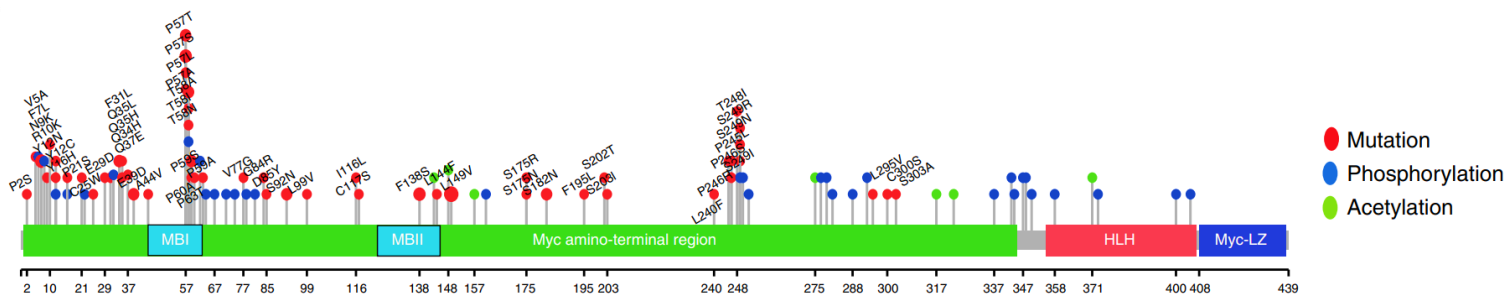


Figure 28: Spectre des mutations (cercles rouges) et des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, cercles bleus ; acétylation, cercles verts) qui touchent la séquence de la protéine c-Myc.

La boîte MBI constitue un site d'accumulation des mutations « hotspots » notamment E39D, A44V, P57S, T58A et T58I. Ces dernières étaient corrélées à la tumorigenèse induite par c-Myc et l'augmentation de la stabilité de la protéine. Ainsi, les mutants c-Myc qui résultent d'une substitution Thr58-Ala ont une forte capacité de transformation, une stabilité plus importante et une capacité pro-apoptotique réduite par rapport à la protéine non mutée. En revanche, les mutations de la Ser62, qui sont aussi fréquentes dans le motif MBI, sont associées aussi à une expression accrue de c-Myc, et une augmentation de la capacité transformatrice des cellules, mais sans affecter l'apoptose (López et al. 2019).



L'exon 1 de *c-MYC* code pour une longue région 5'UTR non traduite qui renferme des structures secondaires « handicapantes » de l'élongation transcriptionnelle. En outre, l'intron 1 de *c-MYC* contient une séquence de liaison pour une protéine nucléaire impliquée dans la régulation transcriptionnelle négative. Cela explique pourquoi ces séquences sont souvent mutées ou éliminées dans les cellules cancéreuses afin de supprimer la régulation négative de l'expression de *c-MYC*. En outre, d'autres régulateurs positifs peuvent entraîner l'expression de *c-MYC* à partir de P1 (Hecht and Aster 2000) (Figure 27).

Comme indiqué plus haut, la phosphorylation de la Ser62 augmente la stabilité de la protéine c-Myc, alors que celle de la Thr58 conduit à sa dégradation. De façon intéressante, la plupart des mutations de *c-MYC* dans les lymphomes comme ici le Burkitt affectent la région N-terminale, plus précisément au niveau du domaine de transactivation TAD dans la région MBI (P57S et T58A). La mutation la plus fréquente touche la Thr58 localisée dans MBI ce qui permet d'augmenter la demi-vie de la protéine. Cette stabilité accrue fait partie de l'activité tumorigénique de *c-MYC* (R. Sears et al. 2000) (Chang et al. 2000) (Cai et al. 2015). Certaines mutations de *c-MYC* notamment dans le domaine MBI augmentent profondément la lymphomagenèse en perdant la capacité d'induire l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Hemann et al. 2005). Un effet similaire a été rapporté pour des mutants au niveau de la région centrale (243-249 aa) (Chakraborty et al. 2015). Cependant, d'autres mutations comme la mutation P138C dans MBII s'accompagnent d'une diminution de l'activité transformante de l'allèle *c-MYC* (Fabien Kuttler et al. 2001).

Ainsi ces mutations ponctuelles de *c-MYC* sont associées à la lymphomagenèse de certains lymphomes de Burkitt, par la résistance à l'apoptose et l'augmentation du potentiel oncogénique qu'elles confèrent aux cellules (Figure 28). Cependant, d'autres mutations génétiques, dites secondaires, touchent d'autres gènes coopérateurs avec *c-MYC* pour induire la lymphomagenèse. Des mutations ponctuelles (90%) et des mutations faux-sens (79.9%) de *TP53* sont trouvées dans les hémopathies malignes y inclus le lymphome de Burkitt (O'Donnell et al. 2005) (Yu, Yu, and Young 2019). Nous avons parlé plus haut du rôle de c-Myc dans l'induction de l'apoptose par la voie p53. C'est pourquoi ces mutations inactivatrices de *TP53* permettent de s'échapper à l'apoptose médiée par *c-MYC*; tout en contribuant à l'instabilité génomique (Cai et al. 2015) (Yu, Yu, and Young 2019). La délétion du *PUMA* (p53-upregulated modulator of apoptosis) promeut le développement de lymphomes médiées par *c-MYC* avec une accélération moins frappante que celle induite par la perte d'un allèle de *p53* (Valente et al. 2016).



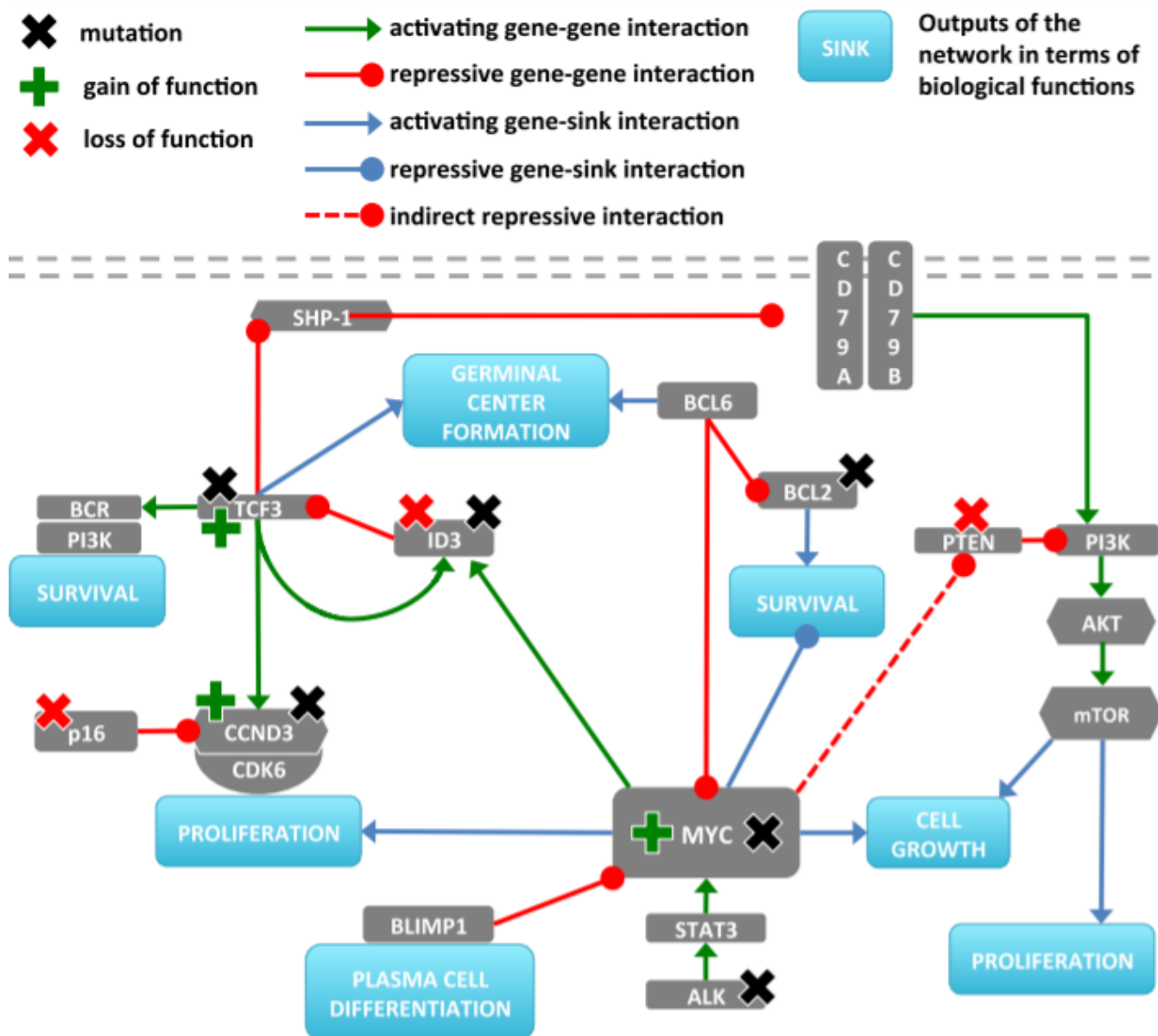


Figure 29: Événements mutationnels coopératifs associés à la lymphomagenèse induite par c-MYC et résultats en termes de fonctions biologiques.

La formation du complexe BCR et CD79A/B (Cluster of Differentiation 79) génère un signal après la reconnaissance de l'antigène par le BCR. Ce signal active la voie de signalisation PI3K qui induit la croissance et la prolifération cellulaire. Le signal BCR peut être régulé négativement par l'activité phosphatase de SHP-1, ce qui explique la régulation négative de SHP-1 observée dans plusieurs tumeurs malignes. La mutation activatrice du facteur TCF3 (11 % des cas du BL) inhibe l'expression de la protéine SHP-1 d'un côté, et active l'expression des protéines CCND3, E2F2 (non indiqué) et favorise de plus l'activation de la voie PI3K de l'autre côté. CCND3, ID3 (inhibiteur négatif du TCF3) sont aussi trouvés mutés dans 38 % et 38-68% des cas du BL, respectivement. Les mutations de TCF3, ID3, CCND3 et PTEN augmente le signal tonique du BCR par l'intermédiaire de PI3K et favorisent la prolifération et la survie cellulaire. Les mutations de c-MYC augmentent la stabilité de la protéine c-Myc et permettent la régulation de l'ensemble des fonctions biologiques (prolifération, dédifférentiation, survie...). Bcl6 permet la répression de c-MYC et Bcl2. Des mutations dans Bcl2 empêche sa régulation par Bcl6. (modifié (Volkan Çakır et al. 2017) (Efremov, Turkalj, and Laurenti 2020)).



Enfin, la tumorigénicité des cellules B, comme dans le cas du lymphome de Burkitt, dépend aussi de l'activation tonique du BCR. Par conséquent, des mutations activatrices d'acteurs de la voie de signalisation de BCR entraînent son activation indépendante d'antigène conduisant à une activation constitutive de la voie NF- κ B, et la signalisation tonique de survie de PI3K (Corso et al. 2016). L'ensemble de ces mutations, retrouvées dans 30 à 70% des Burkitt, constituent un mécanisme de coopération avec les altérations de *c-MYC* dans le développement de ce lymphome B (Cai et al. 2015) (Volkan Çakır et al. 2017) (Efremov, Turkalj, and Laurenti 2020) (Figure 29).

En résumé, les mutations concomitantes de *c-MYC* et d'autres gènes pendant le développement de la cellule B permettent finalement à la cellule B d'échapper à l'apoptose réglementaire normale, puis d'évoluer ultérieurement en cellule maligne. Les interactions coopératives avec *c-MYC* soutiennent l'idée que l'activation/amplification du gène *c-MYC* seul ne peut pas induire le développement du cancer et que d'autres événements, sont indispensables à la cancérogenèse.

4. *c-MYC* et autres lymphomes B non-Hodgkiniens : cas des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)

La surexpression de *c-Myc* due à des processus de translocations chromosomiques ou d'autres mécanismes, est retrouvée chez des patients présentant des lymphomes très agressifs. Concernant les hémopathies malignes et, en plus du lymphome de Burkitt, des réarrangements de *c-MYC* sont retrouvés dans un autre groupe de lymphomes très agressifs, les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL, Diffuse Large B-Cell Lymphoma). Ainsi dans 10 à 15 % des DLBCL *c-Myc* est constitutivement exprimée, le plus souvent suite à des translocations chromosomiques impliquant le locus *IGH* ou *IGL* (Barrans et al. 2010).

4.1. Aspects morphologiques et phénotypiques

Les DLBCL sont des lymphomes très hétérogènes génétiquement et phénotypiquement et qui appartiennent à la famille des lymphomes non-hodgkiniens. Ils représentent 30 à 40 % de lymphomes chez les adultes et concernent plus rarement les enfants (S. Li, Young, and Medeiros 2018). Les tumeurs sont formées des cellules atypiques de taille moyenne à grande qui s'organisent de façon diffuse modifiant totalement ou partiellement l'architecture ganglionnaire ou extra ganglionnaire normale. Les cellules néoplasiques expriment des antigènes des cellules B tels que CD20, CD19, CD79a, des facteurs de transcription des cellules B : PAX5, Oct2 ; de plus, les cellules B tumorales expriment d'une façon variable Bcl2,



Tableau 1: Les caractéristiques communes et distinctives du lymphome de Burkitt (BL), du lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), et le lymphome non-classifiable (gray zone). (Jong 2009)

	DLBCL	gray zone	BL
Morphology	Variable, ranging from medium-sized to large, pleiomorphic nuclei with a large morphological range	BL-like morphology wit or without large cells	Cohesive, starry-sky, medium-sized, round nuclei with multiple small nucleoli
Immunophenotype	BCL-2, CD10, BCL-6, MUM-1 highly variable Ki-67 30->95%	BCL-2 often strong, CD10 mostly+, BCL-6 mostly +, MUM-1 variable Ki-67 50->95%	BCL-2-, CD10+, BCL-6+, MUM-1 variable Ki-67 >95%
<i>MYC</i> translocation	5-15%	80%	90-100%
Non/ <i>I</i> partner in <i>MYC</i> translocation	40%	40%	None
<i>BCL2</i> translocation	20-30%	45%	No
<i>BCL6</i> translocation	30%	9%	No
Simple karyotype	Rarely	Rarely	Typical
Complex karyotype	Generally	Generally	No

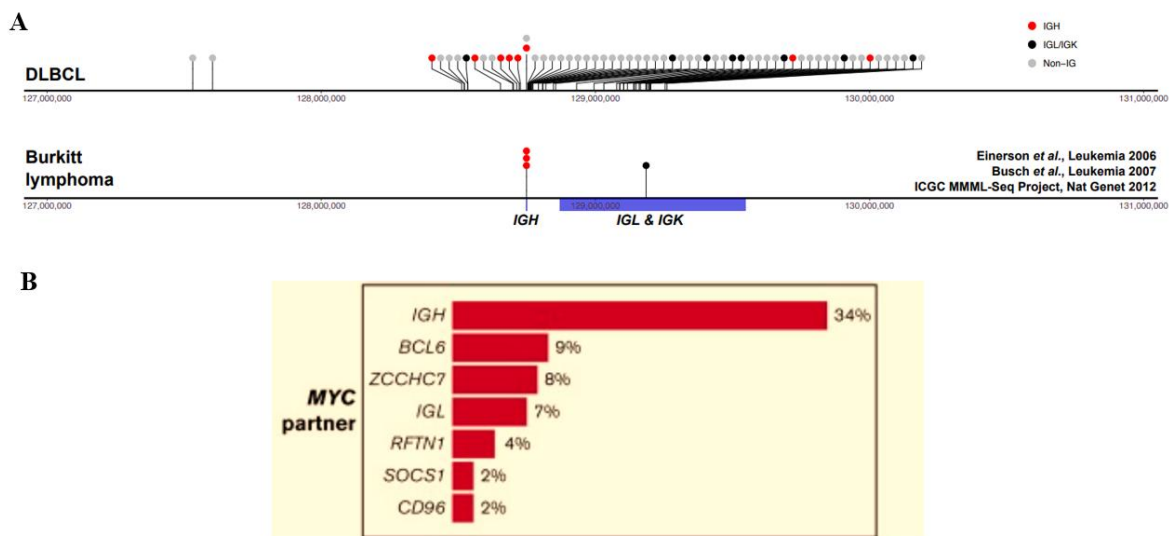


Figure 30: Localisation des réarrangements de c-MYC dans le Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) et le lymphome de Burkitt (BL).

A. Comparaison des réarrangements de c-MYC dans le DLBCL et BL. L'axe horizontal représente l'espace génomique sur le chromosome 8. Les traits verticaux représentent les points de cassures des translocations. Les cercles rouges, noirs et gris représentent les partenaires de c-MYC : IGH, IGL et les non-IG respectivement.

B. Les gènes partenaires de c-MYC dans les translocations et leur pourcentage dans le DLBCL sont présentés. ZCCHC7 : zinc finger CCHC-type containing 7, RFTN1 : raftlin, lipid raft linker 1, SOCS1: suppressor of cytokine signaling protein 1, CD96 : Cluster of Differentiation 96 (modifié (Chong et al. 2018)).



protéine anti-apoptotique et / ou de Bcl6, facteur de transcription exprimé comme on l'a vu dans les cellules B des centres germinatifs (Nakamura et al. 2002).

4.2. Sous-types et origines de DLBCL

Deux principaux sous-groupes de DLBCL ont été identifiés : un type centro-folliculaire (Germinal Center-like B, GCB, 40-50% des patients) et un type B Activé (Activated B-like, ABC, 50-60% des patients) qui avaient des modèles d'expression de gènes indicatifs de différents stades de la différenciation des cellules B (Alizadeh et al. 2000). Ainsi, le sous-type GCB correspondant à des cellules B au stade GC, et le sous-type ABC à des cellules B activées en voie de différenciation plasmoblastique. Un troisième sous-type « non classifié » (10-15% des patients) a été intégré dans la classification des lymphomes de 2008 de l'OMS et qui partage notamment des caractéristiques intermédiaires entre le lymphome de Burkitt et les DLBCL (Jong 2009) (Chettiankandy et al. 2016) (Tableau 1) et (Figure 30). Le profil DLBCL de type ABC a un plus mauvais pronostic que le profil DLBCL de type GCB (Nakamura et al. 2002). Cette différence se retrouve encore de nos jours chez les patients traités avec les traitements standards (polychimiothérapie CHOP et anti-CD20, rituximab) (Lenz and Staudt 2010) (Chiappella et al. 2017).

La classification mondiale des lymphomes a été revue en 2016, et a reconnu l'importance de la prise en compte d'autres sous-types notamment plus agressifs, bien qu'heureusement plus rares (Swerdlow et al. 2016). Cette classification basée sur les caractéristiques moléculaires permet de distinguer plusieurs entités de DLBCL retrouvées majoritairement au sein des GCB: les lymphomes dans lesquels auront lieu une surexpression de l'oncogène *c-MYC* et de Bcl2 (> 40 % et >50 % par immunohistochimie, respectivement) non liés aux réarrangements de chromosomiques sont dits « Double-expressor lymphoma » (DEL) (Riedell and Smith 2018) (Karube and Campo 2015). De plus, dans certains cas (6-14% des DLBCL) les cellules B tumorales présentent des réarrangements de *c-MYC* et *BCL2* (sur le chromosome 18q21) et/ou *BCL6* (sur le chromosome 3q27) définissant les lymphomes double-hit ou triple-hit (DHL /THL, respectivement) (Rosenwald, Sehn, and Maucort-Boulch 2018) qui sont associés souvent à un mauvais pronostic. L'OMS les a placé dans une entité à part, les High-grade B-cell lymphoma » (HGBL). Ces lymphomes sont de très mauvais pronostic et sans vraiment d'alternative thérapeutique à proposer aux patients actuellement. Ces dernières entités restent très rares (5 à 10% des DLBCL) par rapport aux DEL qui représentent 25 à 35% des cas de



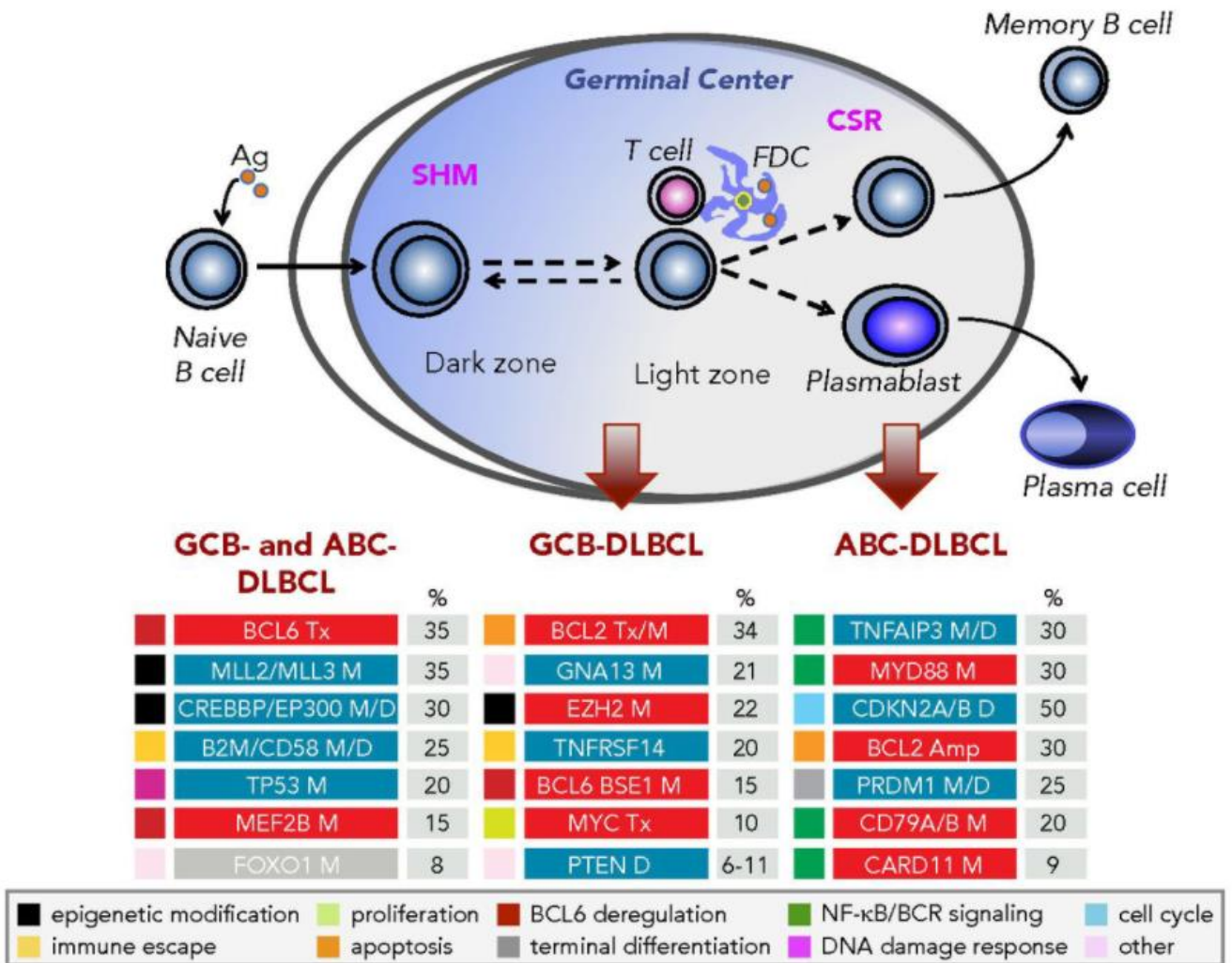


Figure 31: Origine cellulaire et aberrations génétiques associées à chaque sous-type de DLBCL.

Les aberrations génétiques qui caractérisent le sous-type de DLBCL GCB distinct de celui du sous-type de DLBCL ABC ainsi que les lésions génétiques communes sont indiquées. Les lésions génétiques fréquentes du GCB incluent les translocations chromosomiques de BCL2 et/ou de c-MYC, qui conduisent à leur surexpression, leur permettant de contourner la répression transcriptionnelle médiée par BCL6. Alors que les aberrations génétiques caractéristiques du sous-type ABC DLBCL incluent des mutations dans MYD88, CD79A/B, CARD11, une délétion de CDKN2A/B et PRDM1 qui conduisent ensuite à l'activation de NF-κB servant la lymphomagenèse. Les codes de couleur indiquent la voie biologique impliquée et les pourcentages des mutations (M), des translocations (Tx) et des délétions (D) sont indiqués (Pasqualucci and Dalla-Favera 2018).



DLBCL, et sont retrouvées plus fortement dans le groupe ABC (33-46% ABC, contre 17% pour le sous-type GCB) (Y. Li et al. 2013) (S. Li, Young, and Medeiros 2018) (Tableau 1).

4.3. Les altérations génétiques de *c-MYC* dans les DLBCL

La surexpression de *c-Myc* dans DLBCL peut être due à un gain de copie (une à deux copies) (19 à 38%), aux translocations (5 à 14%), une amplification (nombre de copie du gène > à 3) (2%), ou des mutations (32%) (L. Pasqualucci et al. 2001) (Valera et al. 2013) (Nowakowski and Czuczman 2015).

Concernant les translocations, il est intéressant de noter que les réarrangements dans les Burkitt sont différents que ceux de DLBCL, les translocations de *c-MYC* et les loci d'*IGH* sont plus fréquentes dans le lymphome de Burkitt au contraire dans DLBCL qui sont souvent avec *IGL*. Comme dans le lymphome Burkitt, ces altérations géniques peuvent conduire à un changement de promoteur de P2 à P1 ou à une modification du profil de phosphorylation de la protéine permettant d'augmenter sa stabilité (L. Pasqualucci et al. 2001).

La résistance et la pathogénicité des DLBCL surexprimant *c-Myc* peuvent être expliquées par de la surexpression de *c-Myc* due à l'activité constitutive de NF- κ B surtout dans les cellules ABC DLBCL ou à des mutations qui touchent d'autres gènes comme le *TP53*, *MYD88*. En revanche, dans les cellules GCB DLBCL, d'autres types d'anomalies peuvent contribuer à l'agressivité de ces formes de lymphomes en plus de *c-Myc*, impliquant notamment des modifications épigénétiques (la méthylation et l'acétylation) telles que les mutations d'*EZH2* (Histone-Lysine N-Methyltransferase), *CREBBP* (Histone Lysine Acetyltransferase), et des voies de signalisation PI3K et JAK/STAT (Laura Pasqualucci and Dalla-Favera 2018) (S. Li, Young, and Medeiros 2018) (Figure 31).

En ce qui concerne les mutations de *c-MYC* dans le DLBCL, elles ne sont pas aussi bien caractérisées que les translocations de *c-MYC*. Une étude en 2016 réalisée par Xu-Monette et ses collègues montre que 33.3 % des mutations touchent le gène *c-MYC* et 16.1% des mutations faux-sens sont au niveau de la protéine *c-Myc* (Xu-Monette et al. 2016). Les mutations qui affectent la Thr58 et la Phe138 représentent uniquement 2% des cas de DLBCL et sont associées à des translocations *c-MYC* et à un mauvais pronostic. Cet impacte pronostic peut être dû à des répercussions sur les fonctions oncogéniques de *c-MYC*. Par contre, aucune association significative est observée entre les mutations de *c-MYC*, définies comme étant >2 variants nucléotidiques simples et les résultats cliniques du GCB DLBCL. De plus, ce type de



mutations n'a pas été identifié dans les ABC DLBCL. Autrement dit, les mutations de *c-MYC* sont plutôt passagères et non des mutations principales dans le développement du DLBCL (Xia and Zhang 2020).

Les études sur l'amplification de *c-MYC* ont été limitées et confluctuelles. Le nombre de copies du gène *c-MYC* est plus fréquent dans le GCB DLBCL que dans le groupe ABC DLBCL. Deux études comparatives entre des groupes de patients DLBCL présentant un profil *c-MYC* amplifié et un profil *c-MYC* non modifié (pas de translocation ni d'amplification) montrent qu'il n'y a pas de différence significative de taux de survie à 2 ans. Une autre étude tend à expliquer cet effet par l'absence de relation évidente entre une expression élevée de *c-MYC* et une augmentation du nombre de copies. Par contre, certaines études ont associé l'amplification de *c-MYC* à un mauvais pronostic comme le cas des patients de DLBCL avec lymphome à double ou triple copie défini par *c-MYC* et l'amplification de *BCL2* et/ou *BCL6* (Xia and Zhang 2020).

Globalement, il semble que l'implication de *c-MYC* dans le DLBCL favorise la résistance à l'apoptose plutôt que la prolifération. Cette résistance est complétée par des aberrations d'autres gènes, notamment *BCL6* et *BCL2*.

4.4. Traitement actuel du DLBCL

Bien que le DLBCL contienne des sous-types distincts, il est considéré comme une maladie hautement « curable » avec une chimiothérapie conventionnelle à base d'anthracycline, telle que le régime CHOP (Cyclophosphamide, l'Hydroxydoxorubicine, Oncovine, Prednisone). Comme pour le BL, un traitement adéquat et rapide est essentiel pour obtenir une survie à long terme dans le DLBCL. L'introduction d'anticorps monoclonaux anti-CD20 (comme le rituximab) au cours des dernières décennies a conduit à une augmentation de la survie d'environ 15 % à 20 % dans tous les groupes d'âge, et a fait du R-CHOP (rituximab +CHOP) l'option de traitement standard. Les méthodes visant à améliorer l'efficacité du R-CHOP ont consisté à raccourcir la durée du cycle, à administrer un plus grand nombre de cycles, à ajouter davantage d'agents cytotoxiques ou à administrer la chimiothérapie sous forme de perfusion à long terme. Actuellement le traitement R-CHOP permet de guérir 50 à 70% des malades atteints de DLBC (Coiffier and Sarkozy 2016) (S. Li, Young, and Medeiros 2018). Cependant, et malgré les succès remportés par le R-CHOP, un sous-ensemble de patients n'est pas guéri, notamment les patients âgés ne pouvant supporter les fortes doses de chimiothérapie, ou des sous-types particulièrement agressifs (Double Hit Lymphome DHL, Triple Hit



Lymphoma THL) pour lesquels il n'existe pas vraiment d'alternatives thérapeutiques, à part sans doute les CAR-T cells introduits très récemment dans les études cliniques (Chavez, Bachmeier, and Kharfan-Dabaja 2019) (Locke et al. 2019) (d'après la thèse de Marine AITAMER : Etude de la production de petites vésicules extracellulaires (dont les exosomes) dans les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL), influence de la voie BDNF/TrkB et impact sur la sensibilité des cellules tumorales aux anti-CD20 (Aitamer 2020)

5. c-Myc et modèles de lymphomes murins

c-Myc étant comme on l'a vu un régulateur de la croissance cellulaire via son action sur le cycle cellulaire, le métabolisme, la différenciation, et la réponse aux dommages à l'ADN, la grande majorité des modèles murins d'étude de la lymphomagenèse ont utilisé une dérégulation du gène *c-MYC* pour mimer les événements de la lymphomagenèse B chez l'homme. L'apport de ces différents modèles murins (utilisant à la fois des transgènes et des stratégies « knock-in », KI) a été déterminant dans la compréhension des mécanismes impliquant *c-MYC* dans le processus de tumorigenèse dans le cas des lymphomes, mais aussi des tumeurs solides.

5.1. Les modèles murins transgéniques

Les modèles de souris génétiquement modifiées reproduisant les altérations et les mutations de *c-MYC* impliquées dans les tumeurs malignes des cellules B constituent un outil précieux pour aider à évaluer non seulement le rôle de *c-MYC* humain dans le processus de la tumorigenèse, mais aussi à développer des moyens de cibler *c-MYC* afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans notre laboratoire mais aussi d'autres groupes, plusieurs modèles ont été créés et utilisés pour étudier la lymphomagenèse B, et notamment le rôle de *c-MYC* dans ce processus. L'équipe de recherche dans laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse ayant beaucoup contribué à la création de ces modèles, nous allons décrire majoritairement ceux produits au sein du laboratoire.

5.1.1. Les modèles murins transgéniques dans le locus IGH

Les modèles murins de dérégulation de *c-MYC* induite par des amplificateurs du locus *IGH* comme modèles de lymphomagenèse des cellules B sont nombreux et visent à reproduire la lymphomagenèse des lymphocytes B matures chez l'homme. Ainsi, des modèles murins transgéniques mimant la translocation de *c-MYC* dans le locus *IGH* ont été créés.



Dans le premier modèle $E\mu$ - c - MYC , où l'amplificateur $E\mu$ a été placé en 5' de l'exon 1 de c - MYC , les souris développent majoritairement des lymphomes à cellules B immatures (pré-B) (Adams et al. 1985). Ce modèle de souris a été utilisé pour étudier les voies de signalisation défectueuses, les dommages génétiques et pour tester de nouveaux traitements thérapeutiques ou des combinaisons de médicaments. Cependant, $E\mu$ n'est pas impliqué ni dans les cassures d'ADN qui se produisent pendant les processus de SHM/CSR (Class-switch recombination) ni dans la translocation de l'oncogène, induite par une action de l'AID pendant la CSR ou la SHM, retrouvée dans la majorité des sous-types de lymphomes B matures humains. De plus, dans les BL chez l'homme les points de cassures des translocations sont retrouvées dans la région VDJ (avec $E\mu$ et la région 3'RR pour le BL endémique) ou la région switch μ (avec la délétion de $E\mu$ et la 3'RR pour le BL sporadique). Ainsi, la région régulatrice 3'RR a été suspectée pour être impliquée dans la dérégulation de l'oncogène c - MYC (Ghazzoui et al. 2017). En effet, le second amplificateur transcriptionnel situé dans le locus IGH est la région régulatrice 3'RR qui contient plusieurs « enhancers » (3 chez la souris, hs3, hs1.2 et hs4), contrôle la transcription μ , la CSR et la SHM dans les cellules B matures. Le rôle de cet élément dans la lymphomagenèse dépendante de c - Myc a été déchiffré par notre équipe dans plusieurs modèles. Un premier modèle consistait en des souris où le transgène, contenant la région 3'RR insérée en 3' du locus endogène de c - MYC , était introduit par « knock-in » dans les cellules ES (souris c - Myc -3'RR KI) (Truffinet et al. 2007). Les souris étaient caractérisées par une augmentation de l'expression de c - Myc déterminant un lymphome de type BL et des lymphomes B diffus anaplasiques. Tous ces lymphomes étaient des cancers des LB matures. Ces travaux démontrent que la région 3'RR du locus IGH peut déréguler c - MYC et initier un lymphome type BL. Dans notre laboratoire, ce modèle a été utilisé pour examiner le rôle de « second hits » dans la lymphomagenèse comme la déficience de p53, la mutation de $Cdk4$ et la modification des signaux toniques du BCR spécifiques à une classe d'Ig. Notre laboratoire a clairement démontré qu'un « second hit » est nécessaire pour accélérer le développement des lymphomes B en plus de la dérégulation de c - MYC . Ces « hits » ciblent des voies de signalisation impliquées à la fois dans la prolifération, l'apoptose et la signalisation cytokinique (Fiancette et al. 2010) (Rouaud et al. 2012) (Vincent-Fabert et al. 2010) (Amin et al. 2014). Cependant ces modifications supplémentaires affectent différemment le phénotype des lymphomes B, leur agressivité et leurs signatures transcriptomiques. Ce modèle a néanmoins été progressivement écarté en raison de la lenteur d'apparition des lymphomes par rapport aux souris $E\mu$ - MYC , et certaines divergences avec les lymphomes B humains (telles que l'absence de mutations des voies apoptotiques p53-ARF-Mdm2) (Ghazzoui et al. 2017; 2020) (Ferrad et al. 2020).



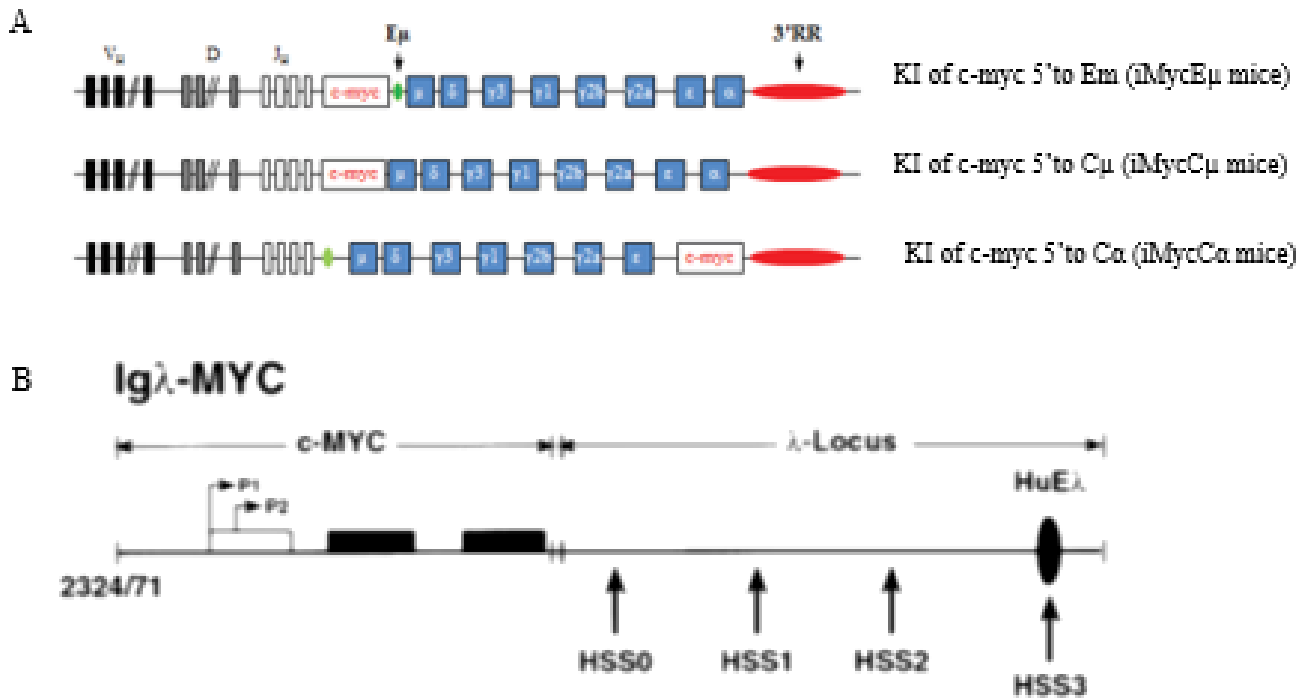


Figure 32: Représentations de différents modèles murins transgéniques dans le locus IGH et IGL.

(A) Représentation schématique des modèles KI (Knock-in) qui implique la dérégulation de *c-MYC* par 3'RR menant à la lymphomagenèse. (d'après (Ghazzaoui et al. 2017))

(B) Structure du transgène utilisé pour la génération de souris λc -MYC.

Le rectangle blanc présente l'exon 1 avec les deux promoteurs P1 et P2 (flèches horizontales). Les rectangles noirs représentent les exons 2 et 3. Les sites hypersensibles à la DNaseI (HSS) dans la LCR de l'Ig λ sont indiqués par des flèches verticales. HuE λ , human Ig λ enhancer (Kovalchuk et al. 2000).



Par conséquent, un modèle de souris combinant les amplificateurs cis-transcriptionnels $E\mu$ et 3'RR a été généré pour étudier la dérégulation de *c-MYC* dans le développement des lymphomes à cellules B immatures et matures. En réalité, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été produites avec une insertion (KI) de *c-MYC* à des positions variées du locus *IGH* (Figure 32) : (i) les souris iMyc $E\mu$ où l'insertion de *c-MYC* est réalisé dans le locus *IGH* juste en 5' de la région $E\mu$ modélisant la situation du BL humain endémique (Park, Kim, et al. 2005) (Park, Shaffer, et al. 2005). Par conséquent *c-MYC* se retrouve sous le contrôle à la fois de $E\mu$ et la région 3'RR dans les cellules B immatures et matures ; ces souris développent comme attendu des lymphomes B avec des altérations de l'axe suppresseur de tumeur p19Arf-Mdm2-p53. (ii) les souris iMyc $C\mu$ où l'insertion de *c-MYC* est réalisée juste en 5' de $C\mu$ avec délétion de $E\mu$ permettant la modélisation du BL sporadique humain (Rosean et al. 2016). Ces souris ont permis de confirmer que la région 3'RR seule est suffisante pour déréguler *c-MYC* dans les cellules B, et induire le développement de lymphomes ; (iii) les souris iMyc $C\alpha$ où l'insertion de *c-MYC* est réalisée dans la région $C\alpha$ juste en 5' de la région 3'RR (W. C. Cheung et al. 2004). Ces souris développent un lymphome à cellules B mais présentant une faible cinétique (Ghazzoui et al. 2017) (Ferrad et al. 2020) (Ghazzoui et al. 2020).

Tous ces modèles de souris ont permis de clarifier les fonctions de $E\mu$ et 3'RR dans le développement des lymphomes à cellules B, et notamment le rôle de la région 3'RR dans le développement des lymphomes des cellules B matures. Ainsi, cette région 3'RR est apparue comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de certains lymphomes B matures dépendants de *c-Myc*.

5.1.2. Les modèles murins transgéniques dans le locus IGL

Le rôle des région régulatrices des loci *Ig κ* et *Ig λ* dans la dérégulation de *c-Myc* a été aussi étudié par la réalisation de modèles de souris transgéniques par d'autres équipes.

Ainsi les souris $E\kappa$ -SV-Myc ont été produites pour mimer des translocations *IGK-MYC*. Ces modèles ont permis de confirmer le rôle de « l'enhancer » i $E\kappa$ dans la lymphomagenèse ; cependant, ces lymphomes étaient peu pénétrants et avaient une latence plus élevée que le modèle $E\mu$ -*c-Myc* (Adams et al. 1985). Les souris λ *c-MYC* où *c-MYC* était sous le contrôle transcriptionnel des « enhancers » de *Ig λ* ont été ensuite produites (Kovalchuk et al. 2000). (Figure 30). Le transgène humain *c-MYC* est issu de la lignée de lymphome de Burkitt IARC-BL60 dont sa région 5'UTR est mutée. Contrairement au modèle $E\kappa$ -SV-Myc, les souris λ *c-MYC* développent des tumeurs similaires à celles des lymphomes de Burkitt humain ou



« Burkitt like », avec notamment l'aspect de « ciel étoilé » caractéristique de l'histologie des tumeurs de Burkitt. Dans ce cas, les cellules B tumorales sont uniformes et expriment à leur surface l'isotype IgM, le récepteur CD19 alors qu'elles sont négatives pour CD5 et CD23. Une mutation dans la région 5'UTR entraîne le « shift » vers une utilisation prédominante du promoteur P1 plutôt que P2 et l'expression de *c-MYC* exclusivement dans les cellules B matures, au contraire du modèle E μ -MYC. Les souris meurent entre 38 et 216 jours à cause du lymphome (Kovalchuk et al. 2000). Les lymphomes de ce modèle sont fréquemment associés à des mutations du gène *TP53* similaire aux mutations trouvées dans les lymphomes du Burkitt (Biegging, Amick, and Longnecker 2009) (Kasprzyk, Sura, and Dzikiewicz-Krawczyk 2021).

Bien que ces modèles de souris transgéniques ne peuvent pas rendre compte de la diversité des mécanismes (exemple les mutations qui peuvent aussi se produire) et des translocations « naturelles » retrouvées dans les tumeurs humaines, ils ont permis de confirmer le rôle des dérégulations de *c-Myc* dans les lymphomes B. De plus, ils ont contribué à isoler la part relative jouée par les différentes régions régulatrices des gènes des Ig dans ces dérégulations, aboutissant finalement à une surexpression de l'oncogène. Finalement ils constituent un outil *in vivo* intéressant pour étudier et tester de nouveaux traitements pour ces cancers.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin λc -MYC pour développer notre modèle λc -MYC ($A^{vy/a}$) issu du croisement d'une souris λc -MYC avec une souris A^{vy} (décrit ci-dessous).

5.2 Autres modèles murins : cas des modèles d'étude de la méthylation du génome.

L'hypométhylation du génome entier est souvent associée aux cancers y compris les lymphomes. Dans le but de tester cette hypothèse dans le cas des lymphomes B, nous avons utilisé un deuxième modèle isogénique dans notre travail de thèse, le modèle « Agouti Viable Yellow » (A^{vy}) qui constitue un modèle de variation épigénétique et d'hérédité. Dans le cadre de notre thèse nous avons utilisé les souris A^{vy} et réaliser un croisement avec les souris λc -MYC pour analyser l'effet de la méthylation sur le développement des lymphomes type Burkitt. Nous allons décrire ce modèle dans la première partie de nos travaux.

En conclusion de cette dernière partie de notre introduction bibliographique « *c-Myc* et Lymphomes B », nous avons vu que la dérégulation de l'expression de *c-MYC* a un effet



significatif sur le développement des lymphomes. Associé à d'autres mutations, *c-MYC* inhibe la différenciation des cellules B du CG et entraîne la prolifération des cellules tumorales. Les translocations de *c-MYC* sont des caractéristiques (« hallmark ») des BL médiées par l'AID pendant la SHM et la CSR. Ces translocations conduisent à la juxtaposition d'éléments de contrôle transcriptionnel du locus *Ig* au promoteur *c-MYC*. Des altérations du gène *c-MYC* ont été identifiées dans d'autres néoplasmes des cellules B. Un réarrangement de *c-MYC*, accompagné d'un réarrangement de *BCL2* et *BCL6* ou des deux, a été observé dans de nombreux cas de DLBCL. En outre, l'expression de *c-MYC* a été associée à un comportement clinique agressif et à un mauvais pronostic. Par ailleurs, *c-MYC* est également impliqué dans les tumeurs solides telles que le cancer du sein, le cancer du colon, le neuroblastome... Étant donné que *c-Myc* est un " moteur " qui contrôle presque toutes les fonctions vitales des cellules : la prolifération, la différenciation, l'apoptose, le métabolisme..., il est important d'élargir le champ des recherches pour approfondir les connaissances des mécanismes de dérégulation de *c-MYC* et sur les formes protéiques générées par ces modifications de cet oncogène. La meilleure connaissance de ces stratégies, permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à leur contrôle strict de l'expression de *c-Myc*, devrait faciliter la découverte de nouvelles cibles et de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans cette perspective que se situaient au démarrage de notre thèse, les objectifs de notre travail de recherche.



Objectifs



Le gène *c-MYC* est régulé par des mécanismes complexes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Étant donné que ce gène joue des rôles physiologiques importants, la dérégulation de son expression est susceptible de nuire à la cellule. En effet, depuis sa découverte, *c-MYC* s'est révélé être un activateur très puissant de la cancérogenèse et a été associé à un large éventail de cancers (Dhanasekaran et al. 2022). Il est considéré comme un prototype d'activation d'oncogène par translocation chromosomique mais aussi par un large spectre de mécanismes directs et indirects qui ciblent son expression et/ou son activité, comme nous l'avons décrit précédemment (signalisation activée en amont, mutations ponctuelles, traduction et/ou stabilité accrue de la protéine). *c-MYC* est transcrit à partir des promoteurs P1 et P2 mais dans les cellules cancéreuses, à l'inverse des cellules normales, le rapport entre les transcripts issus de P1 et P2 est élevé ; c'est notamment en raison d'un « shift » résultant des translocations qui juxtaposent le gène *c-MYC* à de puissants éléments activateurs, comme dans le cas du BL. Les transcripts de P1 et P2 diffèrent par la longueur de leur région 5'UTR. Comme nous l'avons vu dans la bibliographie, des études antérieures ont démontré la présence d'un IRES dans la région 5' non-traduite de l'ARNm P2 situé juste en amont de CUG. Cependant, les transcripts de P1 et P2 peuvent coder trois produits protéiques à partir d'une initiation alternée à trois codons de départ dans le cadre de lecture, CUG, AUG et AUG, ce qui donne trois protéines désignées *c-Myc1*, *c-Myc2* et *c-MycS*. Toutefois, l'isoforme *c-Myc2* est majoritaire dans les cellules tumorales. De plus, comme évoqué dans notre étude bibliographique, une seule étude a rapporté la présence d'un transcript obtenu par épissage alternatif codant pour *c-Myc2*. En outre, aucune étude n'exclut la possibilité de la présence de variants transcriptionnels et n'aborde leur capacité potentielle à coder différentes isoformes protéiques de *c-Myc*. Par conséquent, l'objectif de notre thèse était d'étudier plus en profondeur l'effet du « shift » de promoteur sur l'expression et la répartition des protéines *c-Myc* dans les lymphomes B. Pour cela, nous nous sommes intéressés à séquencer :

- d'un part les transcripts de *c-MYC* dans notre modèle murin (qui nous permettait en plus d'aborder le rôle de la méthylation)
- d'autre part dans différentes lignées cellulaires de lymphomes B humains, plus particulièrement dans les cellules de lymphome de Burkitt.

Ces études devaient nous permettre d'identifier de potentiels variants hétérogènes des ARNm de *c-MYC* et de contribuer à une meilleure caractérisation du produit protéique final dans les lymphomes B.



Chapitre II. Résultats



1. Etude préliminaire : Méthylation du génome, *c-MYC* et lymphomes

1.1. INTRODUCTION

Par rapport aux cellules normales, les cellules cancéreuses présentent des perturbations majeures dans leur profil de méthylation de l'ADN. Des modifications du niveau global de méthylation (hypométhylation globale) et du profil de méthylation de gènes particuliers (hyperméthylation spécifique de gènes) sont caractéristiques de différents types de cellules cancéreuses. La méthylation de l'ADN est réalisée par des enzymes appelées DNA méthyltransférases (DNMTs) qui catalysent le transfert d'un groupe méthyle en position 5' d'une cytosine d'un dinucléotide *CpG*. Dans cette réaction, la S- adénylméthionine (SAM) est le donneur du groupe méthyle. Comme la majorité des modifications épigénétiques, la méthylation de l'ADN est réversible. La déméthylation de l'ADN est soit la conséquence d'un manque de maintien du profil de méthylation au cours de la réplication (déméthylation passive), soit il s'agit d'un processus de déméthylation active nécessitant plusieurs étapes enzymatiques d'oxydation et de déamination, suivies de réparation de l'ADN (Schnekenburger and Diederich 2015).

L'hypométhylation est observée dans une grande variété de tumeurs malignes solides et hématologiques, y compris les lymphomes (Liu et al. 2021) (Martisova et al. 2021). Une corrélation entre l'instabilité génomique et l'hypométhylation globale, une autre caractéristique commune des cellules tumorales, a été démontrée et attribuée à une expression génique dérégulée, une activation rétrovirale et une recombinaison homologue accrue. Plus précisément, l'apparition d'hypométhylation dans les éléments répétitifs de l'ADN, qui sont normalement fortement méthylés, entraîne une augmentation de la transcription à partir des éléments transposables et ensuite une instabilité génomique accrue. En outre, l'hypométhylation de l'ADN au niveau de promoteurs spécifiques joue un rôle important dans l'activation de gènes, en particulier d'oncogènes tels que *c-MYC* et *RAS* (Cheah, Wallace, and Hoffman 1984) (H.-H. Cheung et al. 2009) (Kretzmer, Bernhart, Wang, Haake, Weniger, Bergmann, et al. 2015) (Martisova et al. 2021).

Cependant, l'hypométhylation globale des cellules cancéreuses peut aussi s'accompagner d'événements d'hyperméthylation spécifiques à certaines régions. Les régions qui sont des cibles fréquentes de l'hyperméthylation sont les îlots *CpG*. Ces derniers sont des régions riches en *CpG* d'environ 1 kilobase (kb) qui sont généralement associées au promoteur ou à l'extrémité 5' des gènes. De plus, la méthylation des sites de *CpG* est rare dans les cellules normales. L'hyperméthylation de l'ADN agit comme un mécanisme alternatif pour l'inactivation des gènes. Une méthylation anormale des *CpG* peut réprimer efficacement la transcription des gènes associés d'une manière similaire aux mutations et aux délétions et



agit comme un "hit" pour la génération de tumeurs. Il existe de nombreux exemples d'hyperméthylation aberrante des sites *CpG* de promoteur de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (H.-H. Cheung et al. 2009) (Kretzmer, Bernhart, Wang, Haake, Weniger, Radlwimmer, et al. 2015) (Liu et al. 2021).

C'est pourquoi nous avons décidé de tester une hypothèse qui suggère que l'inversion de l'hypométhylation de l'ADN pourrait diminuer l'incidence du cancer. L'une des perspectives offertes par cette hypothèse est de compléter le régime alimentaire maternel, pendant la grossesse, par des donneurs de méthyle (tels que le folate), et de déterminer si cette supplémentation pourrait bloquer ou atténuer le développement du lymphome.

Dans cette perspective, nous avons décidé dans un premier temps de créer un modèle qui nous permettrait à la fois de suivre le développement du cancer (dans notre cas, le lymphome de Burkitt) et d'estimer le degré de méthylation génomique. Le modèle choisi λc -*MYC* (A^{vy}/a) est dérivé d'un croisement entre une souris noire λc -*MYC*, qui développe un lymphome de Burkitt « human-like » et une souris jaune A^{vy}/a dont la couleur du pelage reflète le degré de méthylation des *CpG* au locus A^{vy} .

Le gène *Agouti* (*A*) qui favorise la phéomélanogenèse présente plusieurs allèles notamment l'allèle muté *a* chez la souris, avec perte de fonction, exprimé à l'état homozygote et conduisant à la couleur noire des souris. Une autre mutation, qui caractérise l'allèle *agouti* « A^{vy} », consiste en l'insertion anti-sens d'un rétrotransposon *IAP* (*Intracisternal A-Particle*) dans le pseudoexon 1A du locus *agouti*, en amont de la région transcrite codant pour la protéine de signalisation *agouti* (ASP, *Agouti signalling protein*). L'allèle *agouti* « A^{vy} » est dominant par rapport à l'allèle non-*agouti* « *a* ». Ces rétroéléments, dont le promoteur est situé dans sa région 5' *LTR* (5' *Long Terminal Repeat*), sont généralement maintenus dans un statut « épigénétique silencieux » avec une méthylation des dinucléotides *CpG*. Quand le promoteur de l'*IAP* est actif (non méthylé) il contrôle l'expression du gène *agouti* conduisant à un effet pléiotrope associé à une expression ectopique de la protéine *Agouti*. Parmi ces effets pléiotropes on peut citer notamment, un pelage jaune, une obésité et une prédisposition aux cancers. Dans le cas d'une hyperméthylation du promoteur de l'*IAP* « promoteur silencieux » le gène *agouti* s'exprime de façon normale au cours du cycle pileux, et détermine la couleur appelée « pseudoagouti » des souris avec une masse corporelle normale. (Morgan et al. 1999) (Wolff, Roberts, and Mountjoy 1999) (Cropley et al. 2010). Donc A^{vy} s'exprime de manière variable chez les souris génétiquement identiques en raison de modifications épigénétiques établies au cours du développement précoce telle que la méthylation. Selon de degré de la méthylation des *CpG*, la



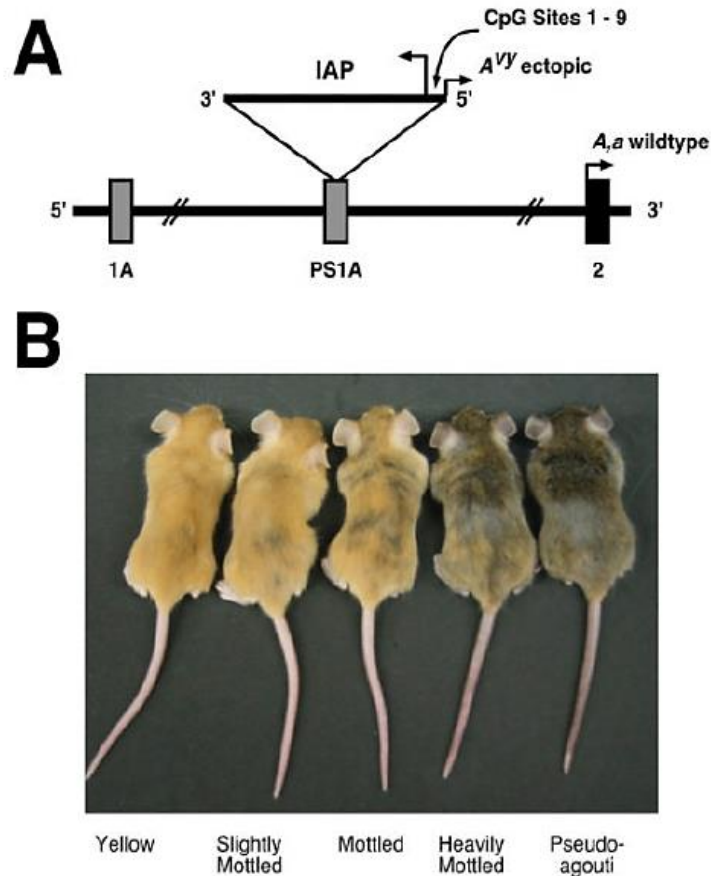


Figure 33: L'allèle *A^{Vy}* et le spectre de couleur de pelage des souris *A^{Vy}*.

A. L'insertion du rétrotransposon IAP dans une direction antisens dans le pseudoexon 1A (PS1A) du gène murin *agouti*. La petite flèche horizontale (*A^{Vy}*) présente le promoteur cryptique d'expression ectopique d'*agouti*. Le promoteur dans l'exon 2 (rectangle noir) initie la transcription des allèles *A* et *a*. *B.* Le phénotype des souris de génotype *A^{Vy}/a* dépend de l'expression de l'allèle *A^{Vy}*. La couleur jaune (à gauche) s'explique par une forte expression de l'allèle *A^{Vy}* (non méthylé) et une synthèse unique de la phéomélanine pigment de couleur jaune-rouge. Une augmentation du pourcentage de méthylation des sites CpG de l'IAP fait que la synthèse d'eumélanine, un pigment de couleur brun-noir, se fait au détriment de la phéomélanine, d'où le spectre de phénotypes de jaune tacheté jusqu'au agouti complet (Dolinoy 2008).



couleur de pelage va du jaune complet (A^{vy} non-méthylé) en passant par des degrés variables de jaune/agouti tacheté ou pseudoagouti (Dolinoy 2008) (Figure 33).

Dans le cadre de notre thèse nous avons utilisé ce modèle pour réaliser un croisement avec les souris $\lambda c-MYC$ pour analyser l'effet de la méthylation sur le développement des lymphomes de type Burkitt. Les souris issues de ce croisement ont une couleur de pelage qui va du jaune complet (A^{vy} non-méthylé) en passant par des degrés variables de jaune/agouti tacheté ou pseudoagouti.

Notre hypothèse était que la couleur du pelage des souris porteuses de l'allèle A^{vy} , via le statut de méthylation de cet allèle muté, pourrait être utilisée comme un bioindicateur de la méthylation du génome. Nous avons alors dans un premier temps essayer de corréler l'apparition de tumeurs de « BL-like » avec la couleur du pelage des souris obtenues suite au croisement.

1.2. MATERIELS & METHODES

1.2.1. Croisement et classification des souris

Les souris $\lambda c-MYC$ sur un fond C57BL/6 ont été aimablement fournies par le Pr. Georg Bornkamm (Centre Helmholtz, Munich, Allemagne). Le modèle de souris transgénique A^{vy}/a a été fourni par le Pr. David Skaar (North Carolina State University, United States).

Toutes les procédures ont été menées dans le cadre d'un protocole approuvé selon les directives européennes pour l'expérimentation animale (numéro d'autorisation national français : 87-022 et numéro d'enregistrement du comité d'éthique français " CREEAL " : 09-07-2012).


Notre modèle désigné $\lambda c-MYC (A^{vy}/a)$ est ainsi dérivé d'un croisement entre une souris noire $\lambda c-MYC$, qui développe un lymphome de Burkitt et une souris jaune A^{vy}/a . A l'âge de ~ 3 mois et après avoir vérifié le génotype des souris, nous avons séparé les souris selon leur couleur (jaune, tacheté, mosaïque et agouti) et leur génotype : $\lambda c-MYC^+(A^{vy}/a)$ (test PCR positif), ou $\lambda c-MYC^-(A^{vy}/a)$ (test PCR négatif). En parallèle nous avons poursuivi les accouplements pour maintenir la lignée des souris $\lambda c-MYC (A^{vy}/a)$.

Cela nous a permis de classer enfin les souris issues de ce croisement selon la couleur de pelage en 3 groupes : le groupe 1 est composé de souris de couleur jaune (A^{vy} non méthylé ou faiblement méthylé) ; dans le groupe 2, les souris ont une couleur qui passe par différents degrés de jaune tacheté/agouti ou pseudoagouti (A^{vy} modérément méthylé) et le 3ème groupe complètement agouti (brun) (A^{vy} méthylé).



Tableau 2: Nombre de souris ayant développé ou pas des tumeurs, classées par couleur de pelage.

Nombre de souris selon la couleur de pelage	Nombre de souris qui sont <i>c-MYC</i> ⁺	Nombre de souris qui développent une tumeur ou pas	
		OUI	NON
35 noires	18 <i>c-MYC</i> ⁺	11	7
22 jaunes	9 <i>c-MYC</i> ⁺	3	6
3 tachetées	1 <i>c-MYC</i> ⁺	1	/
21 mosaïques	7 <i>c-MYC</i> ⁺	5	2
17 agouties	7 <i>c-MYC</i> ⁺	1	6



Non méthylé

Modérément méthylé

Fortement méthylé



Figure 34: Le lymphome de Burkitt s'est développé après 3 mois chez $\lambda c-MYC(Avy/a)$ (souris avec différents degrés de couleur jaune/tacheté/agouti) et $\lambda c-MYC$ (souris noire).



Ensuite, nous avons divisé chaque groupe en deux sous-groupes : les souris qui ont développé un lymphome et les souris qui n'ont en pas développé (Tableau 2).

2. RESULTATS

Nous constatons qu'une partie des souris $\lambda c-MYC^+(A^{y/a})$, quelle que soit la couleur de leur pelage, développent un lymphome de type Burkitt dès l'âge de ~3 mois, ce qui est similaire à la chronologie du développement du lymphome chez les souris $\lambda c-MYC^+$. Cependant, seulement 61 % des souris noires $\lambda c-MYC$ ont développé une tumeur (Tableau 2).

Notre hypothèse suggérait que parmi la progéniture $\lambda c-MYC (A^{y/a})$, les souris jaunes (A^{y} moins méthylé) seraient les plus susceptibles de développer un lymphome alors que les souris pseudoagouti (A^{y} hautement méthylé) auraient dû être moins vulnérables au développement d'une tumeur. Contrairement à ce que nous attendions, les souris jaunes qui développent une tumeur représentent 33% contre 75% des cas de souris tachetées/mosaïques atteintes de lymphome.

De plus nous avons observé que les souris jaunes étaient plus grosses (tendance à l'obésité) et moins fertiles que les souris mosaïques et pseudoagouti (Figure 34). Cette observation est cohérente avec les résultats précédemment obtenus chez le modèle $A^{y/a}$ (Cropley et al. 2010).

Cependant, la pandémie du COVID19 et les périodes de confinement ont impacté fortement la réalisation des croisements de souris et le suivi des animaux ; malheureusement nous avons dû interrompre les expériences sans pouvoir aller au bout, faute de données dans le suivi des animaux. De même nous n'avons pas pu vérifier le degré de méthylation de $c-MYC$ dans les souris.

Finalement, et en conclusion, nos premiers résultats semblent montrer qu'il n'y a pas de corrélation, du moins dans notre modèle, entre l'hypométhylation des souris et le développement de tumeurs. Nous avons donc décidé de ne pas approfondir cette hypothèse. Nous avons ainsi ré-orienté nos recherches vers l'étude de la présence éventuelle de transcrits distincts dans notre modèle murin et dans les lignées cellulaires humaines, et vers la mise en évidence de leur impact sur les isoformes protéiques de c-Myc.



2. Article

Title: Alternative *c-MYC* mRNA transcripts as an additional tool for c-Myc2 and c-MycS production in BL60 tumors.

Dina Ibrahim¹, Nathalie Faumont¹, Danielle Troutaud¹, Jean Feuillard¹, Mona Diab-Assaf² and Ahmad Oulmouden^{1*}

¹Department of Medicine, University of Limoges, France

²Department of Sciences, Lebanese University Fanar, Beirut, Lebanon

Correspondence: Ahmad OULMOUDEN, UMR CNRS 7276 /INSERM U1262, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 rue du Docteur Marcland , 87025 Limoges Cedex, France.

e-mail: ahmad.oulmouden@unilim.fr

doi: <https://doi.org/10.1101/2022.02.18.480896>

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.18.480896v1>

Supplementary information:

Supplementary Figures S1, S2, S3, S4 and S5

Abstract

While studying c-Myc protein expression in several Burkitt lymphoma cell lines and in lymph nodes from a mouse model bearing a translocated *c-MYC* gene from the human BL line IARC-BL60, we surprisingly discovered a complex electrophoretic profile. Indeed, the BL60 cell line carrying the t(8;22) *c-MYC* translocation exhibits a simple pattern, with a single c-Myc2 isoform. Analysis of the *c-MYC* transcripts expressed by tumor lymph nodes in the mouse $\lambda c-MYC$ ($A^{vy/a}$) showed for the first time five transcripts associated with t(8;22) *c-MYC* translocation. The five transcripts were correlated with the production of c-Myc2 and c-MycS, and loss of c-Myc1. The contribution of these transcripts to the oncogenic activation of the t(8;22) *c-MYC* is discussed.

Introduction

The human *c-MYC* proto-oncogene is involved in the control of many cellular processes including cell growth and apoptosis (Thompson 1998). In normal cells, most transcripts of the human proto-oncogene *c-MYC* start at alternative promoters P1 and P2 and encode three proteins designated c-Myc1 (67 kDa), c-Myc2 (64 kDa) and c-MycS (55 kDa) (Stephen R. Hann et al. 1988) (Spotts et al. 1997) (Wierstra and Alves 2008a). These three isoforms arise by alternative initiation of translation starting at three different in-frame codons: a non-canonical CUG for c-Myc1, an AUG located 15 codons downstream for c-Myc2 (Stephen R. Hann et al. 1988), and an AUG 100 codons further downstream for c-MycS (Spotts et al. 1997). The resulting proteins contain the same carboxy-terminal domain, but differ in their N-terminal regions. A third promoter (P3) within the first intron has also been described (Eick et al. 1990). P3 promoter transcriptional activity leads to an mRNA that lacks the N-terminal encoding sequence (15 amino acids) that is specific to c-Myc1. Therefore, the specific function of each of the c-Myc proteins lies in their N-terminal region. The ability to express at least three amino-terminally unique forms of c-Myc protein seems important for the normal function of c-Myc in cell growth control. Indeed, c-Myc1 and c-Myc2 possess different trans-activation efficiencies at the non-canonical CCAAT/enhancer-binding protein-binding site (S. R. Hann et al. 1994). Furthermore, c-Myc2 is predominant in growing cells while c-Myc1 is preferred as cells approach high-density growth arrest (Benassayag et al. 2005). In addition, c-Myc1 exhibits a strong induction of apoptosis compared to c-Myc2. c-MycS which is transiently expressed during rapid cell growth (Spotts et al. 1997), lacks the first 100 amino acids containing two phosphorylation sites (Thr58 and Ser62) involved in the stability of c-Myc proteins to proteosomal degradation (Escamilla-Powers and Sears 2007). Mutations of these sites are often

linked to B-cell lymphomas and are correlated with reduced apoptotic potential (Benassayag et al. 2005). In normal mammalian cells, these c-Myc isoforms do not accumulate singly but in specific combinations or ratios characteristic of a given cell status. Therefore, imbalanced expression of the different c-Myc proteins directly contributes to the loss of cell growth control associated with tumor development (Benassayag et al. 2005).

In Burkitt's lymphoma (BL) cells that have a *c-MYC* chromosomal translocation to one of the immunoglobulin (*IG*) loci on chromosomes 2, 14, or 22, the transcription of a *c-MYC* proto-oncogene is characterized by preferential transcription from the *c-MYC* promoter P1 (Gerbitz et al. 1999b). Shifted promoter P2 to P1 leads to a change in the c-Myc1/c-Myc2 ratio that is often observed in human tumors cell lines (Dooley et al. 1994). In most cases, only c-Myc2 was detected with little or no c-Myc1. Several transgenic mouse models were generated to drive *c-MYC* expression throughout B-cell development under the control of different *Ig* enhancers, in order to mimic the *IG-c-MYC* translocation (Ferrad et al. 2020). The λ c-MYC mouse model bearing a translocated *c-MYC* gene from the human BL line IARC-BL60 exhibits aggressive lymphomas with striking similarities to human BL (Kovalchuk et al. 2000). It was suggested that the mutation within the 5' sequence and promoter shift from P2 to P1 leads to an unbalanced expression of the different c-Myc proteins in BL60. Indeed, BL60 exhibits an increased amount of c-Myc2 and fails to synthesize the detectable levels of c-Myc1 as assessed by Western blot (Cesarman et al. 1987) (Stephen R. Hann et al. 1988).

Here we report for the first time that tumors from lymph nodes of an λ c-MYC ($A^{vy/a}$) mice exhibit five transcripts as new tool to exacerbate the imbalanced expression of c-Myc proteins that may explain the aggressive lymphomas in the λ c-MYC ($A^{vy/a}$) mouse model.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Models

λ c-MYC(*a/a*) mice on a C57BL/6 background were kindly provided by Pr. Georg BORNKAMM (Helmholtz Center, Munich, Germany). The λ c-MYC ($A^{vy/a}$) mouse model used in this work develops a human Burkitt-like lymphoma that is derived from crossing λ c-MYC (*a/a*) mice with Yellow $A^{vy/a}$ mice. A^{vy} mice were kindly provided by Dr. David SKAAR (Department of Biological Sciences, Centre for Human Health and the Environment, North Carolina State, University, Raleigh, NC USA) for epigenetic studies. All animal experiments and protocols were conducted in accordance with European guidelines and regulations for animals used for scientific purposes, implemented in France as follows "Décret n°2012-118 du

1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques”. Considerable efforts were made to minimize the number of animals used and to ensure optimal conditions for their well-being and welfare before, during and after each experiment.

Cell lines

Burkitt's cell lines used in this work were obtained from ATTC, cultured from cryopreserved cells, in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin (100 µg/mL), 1% streptomycin (100 µg/mL), L-Glutamine, sodium pyruvate and vitamins. All cells were cultured in a humidified chamber at 37°C and 5% CO₂. They were not stored beyond the 35th passage. The cell pellets were washed with PBS (phosphate-buffered saline) twice and then used for either RNA or protein extraction.

RNA extraction

RNA was prepared using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I by using RNase free DNase set (Qiagen).

Identification of 5'UTR, 3'UTR and full-length of cDNA

The SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara Bio, Catalog no 634860, USA) was used to perform both 5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1µg of total RNA was used for (from lymph node tumors or cell lines) 5'-RACE-Ready cDNA and 3' -RACE-Ready cDNA. Primer pairs P5'UTR1/UPM (Universal Primer A Mix) and P5'UTR2/UPM were used for PCR amplification using 5'-RACE-Ready cDNA as template to obtain 5'UTR, P3'UTR1/UPM was used to obtain 3'UTR by PCR amplification using 3' -RACE-Ready cDNA as template. By cloning and sequencing (BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit - Thermo Fisher) the 5' and 3' UTRs we designed specific primers to obtain full-cDNA and the corresponding mRNA structure. All primers used in this work are listed in Table1. PCR amplification was performed as follows: denaturation 2 min at 94°C, 35 cycles (94 °C 15 sec, 61 °C 15 sec, 72 °C 1 min), 72°C 2 min.

***In vitro* expression of c-Myc1, c-Myc2 and c-MycS reading frames.**

Reading frame sequences encoding each protein were amplified by PCR (as described above) using primer pairs described in Table 1 and cloned in the pT7CFE1 expression vector (Figure S1). *In vitro* transcription and translation were performed according to manufacturer's instruction (pT7CFE1-CHis Vector for Mammalian Cell-Free Protein Expression; Thermo Fisher).

Protein extraction and Western blot

Fresh or frozen animal tissues (30 mg) were dissected on ice. 2×10^6 cells (extracted tissues or cell culture) were suspended in 50 μ L RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay; BioRad) lysis buffer containing 200 mM PMSF (Alpha-Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, serine protease inhibitor), 100 mM sodium orthovanadate, and a protease inhibitor cocktail (Santa-Cruz Biotech). Lysis was performed on ice for 30 minutes. The soluble protein fraction was recovered after centrifugation at 13,000 rpm at 4°C for 15 minutes. Proteins were assayed by the Bradford method. Then proteins extracted or *in vitro* synthesized proteins, were denatured at 95°C for 3-5 minutes in the presence of β -mercaptoethanol and Laemmli blue.

Equal amounts of denatured proteins (30 μ g/lane) were separated by SDS-PAGE then transferred to PVDF membrane. Nonspecific binding sites were blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.1% Tween-20. After overnight incubation at 4°C with specific primary Ab (9E10, dilution 1/200, sc-40 Santa Cruz Biotechnology), membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary Ab (dilution 1/1000) for 1 h at room temperature and revealed by an enhanced chemiluminescent detection method (Immubilon Western, Millipore). Protein-loading control was performed with GAPDH or β -actin Ab.

Results

***c-MYC* gene translocation and synthesis of c-Myc proteins in Burkitt lymphomas**

In our $\lambda c-MYC$ ($A^{vy/a}$) model mouse (Figure 1) of Burkitt lymphomas (Kovalchuk et al. 2000), we repeatedly obtained a complex electrophoretic pattern on Western blot, notably in lymph node tumors. We consistently observed two bands that could correspond to c-Myc2 and c-MycS with an apparent molecular weight of 64 and 55 kDa respectively in those tumors (Figure 2A). All Burkitt lymphoma cell lines studied exhibit doublet bands (Figure 2B): c-Myc2 (64 kDa) and probably its phosphorylated (Stephen R. Hann et al. 1988) form (65 kDa). Burkitt lymphoma cell lines are considered to express only c-Myc2 (Stephen R. Hann et al. 1988). Since we were unable to explain the presence of the other bands (Figures 2A, 2B), we performed a control test to detect c-Myc proteins.

c-Myc protein production by cell-free translation of a single cloned reading frame

The reading frame encoding c-Myc1, c-Myc2 or c-MycS was cloned into the pT7CFE1 vector (Figure S1), and the corresponding mRNA was translated *in vitro* using a mammalian *in vitro* translation system based on HeLa cell lysates. This experimental approach yielded the proteins detected in Figure 2C. In each case, significant band with apparent molecular weights of 67 kDa (c-Myc1), 64 kDa (c-Myc2) and 55 kDa (c-MycS) were obtained. A minor band corresponding

to the phosphorylated forms (Stephen R. Hann et al. 1988) was also detected. However c-MycS lacks the first 100 amino acids, which contain two phosphorylation sites. Moreover, other phosphorylation sites have been described in the C-terminal region of the c-Myc proteins (Wasylishen et al. 2013). This result validates the capability of the 9E10 antibody used against the C-terminal region to detect the three isoforms of c-Myc protein, and our hypothesis with regard to the bands described in Figures 2A and 2B. Of note, c-Myc1 (P67) was undetectable in both lymph nodes (this work) and Burkitt's lymphoma cell lines (this work and (Stephen R. Hann et al. 1988)).

***c-MYC* transcripts in lymph nodes from $\lambda c-MYC$ mice**

The $\lambda c-MYC$ mouse model was obtained by transgenesis using a 12 Kbp DNA fragment (Figure 1A) from the *c-MYC* translocation t(8;22) of BL60 cell line (Gerbitz et al. 1999b) (Kovalchuk et al. 2000). As the electrophoretic profile of c-Myc proteins in tumors from lymph nodes from $\lambda c-MYC$ (A^{vy}/a) mice was no longer the similar to that described for the BL60 line, with c-Myc2 but also c-MycS (apparent molecular weight of 64 and 55 kDa respectively, Figure 2A), we then analyzed the *c-MYC* transcripts in these tumors.

Total RNA was extracted and the 5' and 3' regions were obtained by RACE-PCR. The *c-MYC* specific primers used are described in Table1. To obtain the 5'UTR (5'UnTranslated Region), we used the primers P5'UTR1 and P5'UTR2 located at exon 1 and exon 2 respectively (Figure 3A) to account for the different promoter activities (P1, P2 or P3) described in the literature. The primer P3'UTR1 (Figure 3A) was used to obtain 3'UTR. The 5' and 3' established regions allowed us to define PFull1, PFull2 and PFull3 primers (Figures 3B, 3C) to obtain the total cDNA and the structure of *c-MYC* mRNAs after sequencing. For the 3' region we repeatedly obtained (Figure S2), the same 3'UTRs for both the lymph nodes and for the BL41 cell line corresponding to the use of the two described polyadenylation sites (Laird-Offringa et al. 1989). Sequence analysis of the cDNA revealed the presence of five *c-MYC* transcripts (Figure 3D), two from transcription through P1 (P1 promoter) and three from P3 (P3 promoter) which is located at intron 1 (Figure 3A). Transcription from P1 has been reported in the BL60 line, but to our knowledge, the nature of the transcripts has not been described. Transcription from P3 has not been reported in the BL60 cells. It is noteworthy that Trans1 (transcript 1) carries the PvuII mutation which has been suggested to be responsible for the production of the single c-Myc2 variant in BL60 cells (Figure 3D and S3). All *c-MYC* transcripts described in this work differ at the 5'UTR and/or at exon 2 (Figure 3). They all have the entire last exon (exon3). In addition the 5'UTR of three transcripts (Trans1,2,3) contains termination codons in all three

reading frames whereas two 5'UTR transcripts (Trans4,5) (Figure S3) are in reading frames of a part of exon 2 and the coding region of c-MycS (see discussion).

P1 promoter transcripts and c-Myc proteins

The genomic region corresponding to transcripts 1 and 2 (Trans1 and Trans2) resulting from P1 promoter use (Figures 3 and S2) revealed that the mature Trans1 mRNA (Figures 3D and S2) is derived from the canonical splicing of a *c-MYC* pre-mRNA (Figures 3B and S2) previously described (Watt et al. 1983). However, Trans2 (revealed in this work) is obtained by an alternative splicing acceptor site within exon 2 (Figures 2B and S3). In both cases, the donor (GT) and acceptor (AG) sites are canonicals. Translation of the two transcripts in the three reading frames predicts (Figure 3D) the formation of c-Myc1 (Trans1) and c-MycS (Trans2) isoforms. Nevertheless, our Western blot experiments (Figure 2A) do not detect the c-Myc1 (p67) isoform. This result is in agreement with previously reported data showing that a substitution near the non-canonical CUG initiation site prevents translation from the CUG site and thus c-Myc1 production (Stephen R. Hann et al. 1988). It is therefore very likely that the translation of Trans1 leads to the formation of c-Myc2 from the AUG initiation codon located at exon 2 (Figures 3 and S3). Taken together, analysis of the two transcripts coupled with the Western blot data (Figure 2A) suggest a production of c-Myc2 (instead of c-Myc1) and c-MycS by *in vivo* translation of Trans1 and Trans2 respectively.

P3 promoter transcripts and c-Myc proteins

A similar analysis of the P3 promoter transcripts (Trans3, Trans4 and Trans5) revealed (Figures 3C and S4) that the Trans4 transcript is derived from the splicing of a pre-mRNA with canonical donor and acceptor sites located at intron 1 while respecting the canonical sites between exon 2 and exon 3. Since Trans4 lacks exon 1 (Figure 3C), translation of this mRNA *in vivo* will necessarily lead to the production of c-Myc2. The two other transcripts (Trans3 and Trans5) were derived from alternative splicing of pre-mRNA using different non-canonical splice donor and acceptor sites at intron 1 and exon 2. If these mRNA were translated *in vivo* they would produce at least (see discussion) the c-MycS isoform. Overall, P3 transcripts will result in the enrichment of c-Myc2 and c-MycS isoforms.

***c-MYC* transcripts and c-Myc proteins in the BL41 cell line.**

Data described above led us to carry out a study of *c-MYC* transcripts and the corresponding proteins in a Burkitt lymphoma cell line.

Total RNA were extracted and subjected to the same RACE-PCR approach to obtain the 5'UTR region and then the total *c-MYC* mRNA expressed by BL41 cells. We used the same primers as above to obtain the 5' and 3' UTRs. We obtained amplifications with primer P5'UTR2 located in the exon 2 (for 5'UTR) and primer P3'UTR1 located in exon 3 (for 3'UTR). We did not obtain any amplification with the other primer P5'UTR1 located in the exon 1.

Sequence analysis of cDNA corresponding to the mRNA showed a single repeatedly obtained transcript (Figures 4 and S5). The 5'UTR was formed by a hybrid sequence including an *IGH* region and the end of intron 1 of *c-MYC*. The rest of the mRNA was transcribed from exons 2 and 3. This hybrid transcript was probably the result of transcriptional activity at the *IGH* locus following the t(8;14) translocation that characterizes the BL41 cell line. The fact that we did not obtain any amplification with the P5'UTR1 primer supports the presence of only *c-MYC* transcripts lacking exon 1. The translation of this mRNA predicts c-Myc2 protein in agreement with previously described data and with the results obtained by Western blot (Figure 2B).

Discussion

In this study, we report for the first time that lymph nodes from the $\lambda c-MYC$ ($A^{vy/a}$) mice exhibit five different *c-MYC* mRNA that invariably lead to the production of c-Myc2 and/or c-MycS as shown by Western blot.

It is now well established that the quantitative and qualitative expression of the two proteins c-Myc1 and c-Myc2 and to a lesser extent c-MycS play an important role in the control of normal (non-cancerous) cell proliferation and cell homeostasis (S. R. Hann et al. 1994) (Batsché and Crémisi 1999). Although the ratio between these three isoforms is difficult to determine because their quantity changes according to stages of the cell cycle, the mechanisms that support the production of c-Myc2 and/or c-MycS promote a cancerous state: the *c-MYC* proto-oncogene becomes the *c-MYC* oncogene (Hann et. 1999) (Spotts et al. 1997).

Virtually all Burkitt lymphoma cell lines show a rearrangement between the *c-MYC* locus and one of the immunoglobulin gene loci. These rearrangements alone or in combination with mutations in the 5' region of the *c-MYC* gene often lead to the production of c-Myc2 alone. Previously, it was shown that the BL60 line carrying the t(8;22) translocation exhibits a shift from promoter 2 to promoter 1 and harbors a substitution that prevents translation from the upstream non-canonical CUG translation site. Thus, BL60 was described to have lost c-Myc1 production and to produce only c-Myc2 (S. R. Hann et al. 1994). It should be noted that the 12 kbp DNA fragment (Figure 1A) from the t(8;22) translocation of the BL60 line used to obtain the $\lambda c-MYC$ mouse (Kovalchuk et al. 2000) contains all the genetic information (including the

c-MYC gene) necessary for the development of an aggressive B lymphoma, particularly in the lymph nodes. In agreement with these previous data, the Trans1 mRNA discovered in this work was derived from the P1 promoter (shift from P2 to P1, as in BL60) and carries the described substitution near the CUG translation site as reported for translation of the only open reading frame of Trans1 which codes for the production c-Myc1. Nevertheless, its presence in Western blots remains undetectable. This observation supports the fact that a mutation near the CUG translation site prevented its use as a translation initiation site and strongly suggests that *in vivo* translation of Trans1 leads to the formation of c-Myc2.

The second mRNA (Trans2) that we found is also from the P1 promoter, also carries the substitution near CUG, but with an alternative splicing at exon 2. The only Myc protein that will be produced if this Trans2 is translated *in vivo* will be c-MycS. This hypothesis is in agreement with our Western blot data.

The other three transcripts (Trans3, 4 and 5) were derived from a transcription at the P3 promoter located in intron 1. The translation of Trans3 predicts the production of c-Myc2 according to the only open reading frame. However, the predictions that can be drawn from the primary structure of Trans4 and 5 are less clear. Indeed, despite different alternative splicing, Trans4 and 5 each present an open reading frame from, respectively, the first and second nucleotides of transcription initiation to the stop codon at the last exon 3 of the *c-MYC* gene. Several potential non-AUG (Diaz de Arce, Noderer, and Wang 2018) sites were located in the 5' region of these two mRNA but their use as translation initiation sites remains to be determined experimentally.

Alternative splicing of pre-mRNA and/or alternative use of promoters play an important role in the genesis and development of different types of cancer. Indeed, many cases of splicing isoforms that lead or promote cancer progression have been identified. For example, cyclin D1b, the oncogenic form of cyclin D1, expressed in lymphomas, results from alternative splicing. Another example is the anti-apoptotic isoform Bcl-xL which is strongly expressed in a large number of tumors to ensure high cell survival (Paronetto, Passacantilli, and Sette 2016). Finally, the use of alternative promoters and/or alternative splicing generates a complex pattern of pro- and anti-apoptotic isoforms of the TP73 gene (Zaika et al. 2002) which is strikingly similar to the mechanism used by the t(8;22) translocation as found in this study, to generate only oncogenic forms of c-Myc.

In summary, we report for the first time the concept of multi-transcript genesis as a tool for the development of Burkitt's lymphoma in the case of t(8;22) translocation. Our work suggests that this type of approach may be useful for the identification of *c-MYC* transcripts with B

lymphoma. Of course, these transcripts will differ depending on the type of B lymphoma associated with specific *c-MYC* dysregulation. The BL41 line used in this work is an example. In this context, an exhaustive study of *c-MYC* transcripts becomes necessary. A nanopore sequencing approach is currently underway and data obtained will provide new diagnostic tools.

Acknowledgements

We would like to thank Dr J Cook Moreau, UMR CNRS 7276, Limoges, France, for the English revision. This study was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the Limousin Region and the Haute Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale contre le Cancer and by the Lyons Club de Corrèze.

References

- Batsché, E., and C. Crémisi. 1999. "Opposite Transcriptional Activity between the Wild Type C-Myc Gene Coding for c-Myc1 and c-Myc2 Proteins and c-Myc1 and c-Myc2 Separately." *Oncogene* 18 (41): 5662–71. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202927>.
- Benassayag, C., L. Montero, N. Colombié, P. Gallant, D. Cribbs, and D. Morello. 2005. "Human C-Myc Isoforms Differentially Regulate Cell Growth and Apoptosis in *Drosophila Melanogaster*." *Molecular and Cellular Biology* 25 (22): 9897–9909. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.9897-9909.2005>.
- Cesarman, E., R. Dalla-Favera, D. Bentley, and M. Groudine. 1987. "Mutations in the First Exon Are Associated with Altered Transcription of C-Myc in Burkitt Lymphoma." *Science (New York, N.Y.)* 238 (4831): 1272–75. <https://doi.org/10.1126/science.3685977>.
- Diaz de Arce, Alexander J., William L. Noderer, and Clifford L. Wang. 2018. "Complete Motif Analysis of Sequence Requirements for Translation Initiation at Non-AUG Start Codons." *Nucleic Acids Research* 46 (2): 985–94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1114>.
- Dooley, S., I. Wundrack, C. Welter, and N. Blin. 1994. "Constitutive C-Myc Overexpression and P1/P2 Promoter Shift in a Small-Cell Lung-Cancer Cell-Line." *International Journal of Oncology* 5 (1): 65–68.
- Eick, D., A. Polack, E. Kofler, G. M. Lenoir, A. B. Rickinson, and G. W. Bornkamm. 1990. "Expression of P0- and P3-RNA from the Normal and Translocated c-Myc Allele in Burkitt's Lymphoma Cells." *Oncogene* 5 (9): 1397–1402.
- Escamilla-Powers, Julianne R., and Rosalie C. Sears. 2007. "A Conserved Pathway That Controls C-Myc Protein Stability through Opposing Phosphorylation Events Occurs in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5432–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611437200>.
- Ferrad, Melissa, Nour Ghazzoui, Hussein Issaoui, Jeanne Cook-Moreau, and Yves Denizot. 2020. "Mouse Models of C-Myc Deregulation Driven by IgH Locus Enhancers as Models of B-Cell Lymphomagenesis." *Frontiers in Immunology* 11: 1564. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01564>.
- Gerbitz, A., J. Mautner, C. Geltinger, K. Hörtnagel, B. Christoph, H. Asenbauer, G. Klobeck, A. Polack, and G. W. Bornkamm. 1999. "Deregulation of the Proto-Oncogene c-Myc through t(8;22) Translocation in Burkitt's Lymphoma." *Oncogene* 18 (9): 1745–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202468>.

- Hann, S. R., M. Dixit, R. C. Sears, and L. Sealy. 1994. "The Alternatively Initiated C-Myc Proteins Differentially Regulate Transcription through a Noncanonical DNA-Binding Site." *Genes & Development* 8 (20): 2441–52. <https://doi.org/10.1101/gad.8.20.2441>.
- Hann, Stephen R., Michael W. King, David L. Bentley, Carl W. Anderson, and Robert N. Eisenman. 1988. "A Non-AUG Translational Initiation in c-Myc Exon 1 Generates an N-Terminally Distinct Protein Whose Synthesis Is Disrupted in Burkitt's Lymphomas." *Cell* 52 (2): 185–95. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90507-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90507-7).
- Kovalchuk, Alexander L., Chen-Feng Qi, Ted A. Torrey, Lekidelu Taddesse-Heath, Lionel Feigenbaum, Sung Sup Park, Armin Gerbitz, et al. 2000. "Burkitt Lymphoma in the Mouse." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (8): 1183–90.
- Laird-Offringa, I A, P Elfferich, H J Knaken, J de Ruyter, and A J van der Eb. 1989. "Analysis of Polyadenylation Site Usage of the C-Myc Oncogene." *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6499–6514.
- Paronetto, Maria Paola, Ilaria Passacantilli, and Claudio Sette. 2016. "Alternative Splicing and Cell Survival: From Tissue Homeostasis to Disease." *Cell Death and Differentiation* 23 (12): 1919–29. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.91>.
- Spotts, G. D., S. V. Patel, Q. Xiao, and S. R. Hann. 1997. "Identification of Downstream-Initiated c-Myc Proteins Which Are Dominant-Negative Inhibitors of Transactivation by Full-Length c-Myc Proteins." *Molecular and Cellular Biology* 17 (3): 1459–68. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1459>.
- Thompson, E. B. 1998. "The Many Roles of C-Myc in Apoptosis." *Annual Review of Physiology* 60: 575–600. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.575>.
- Wasylishen, Amanda R., Michelle Chan-Seng-Yue, Christina Bros, Dharmendra Dingar, William B. Tu, Manpreet Kalkat, Pak-Kei Chan, et al. 2013. "MYC Phosphorylation at Novel Regulatory Regions Suppresses Transforming Activity." *Cancer Research* 73 (21): 6504–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4063>.
- Watt, R., L. W. Stanton, K. B. Marcu, R. C. Gallo, C. M. Croce, and G. Rovera. 1983. "Nucleotide Sequence of Cloned cDNA of Human C-Myc Oncogene." *Nature* 303 (5919): 725–28. <https://doi.org/10.1038/303725a0>.
- Wierstra, Inken, and Jürgen Alves. 2008. "The C-Myc Promoter: Still Mystery and Challenge." *Advances in Cancer Research* 99: 113–333. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(07\)99004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(07)99004-1).
- Zaika, Alex I., Neda Slade, Susan H. Erster, Christine Sansome, Troy W. Joseph, Michael Pearl, Eva Chalas, and Ute M. Moll. 2002. "DeltaNp73, a Dominant-Negative Inhibitor of Wild-Type P53 and TAp73, Is up-Regulated in Human Tumors." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (6): 765–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20020179>.

Table 3: Primers (P) used to obtain the 5'UTR, 3'UTR and total length of cDNAs of c-MYC transcripts where only open reading frames (ORFs) are indicated. The underlined sequence of Orf-c-Myc1, Orf-c-Myc2 and Orf-c-MycS corresponds to the NdeI restriction sites; the underlined sequence of Orfs corresponds to the XhoI restriction site; CTG and ATG: Translation start codon.

Primer (P)	5' to 3' sequence	Localisation	Use for
P5'UTR1	CTGGTTTTCCACTACCCGAAA	Exon1 (Fig.2A)	5'UTR amplification
P5'UTR2	CGTTGAGGGGCATCGTCGCGGG	Exon2 (Fig.2A)	5'UTR amplification
P3'UTR1	CTACGGAACTCTTGTCGTAA	Start at the end of the last exon (Exon3)	3'UTR amplification
PFull1	GACCCCGAGCTGTGCTGCTC	Start at P1:+1 (Fig.2B, S2)	Full-length cDNA
PFull2	GGGAACAGCCGCAGCGGAGGG	Start at P3:+1 (Fig.2C, S3)	Full-length cDNA
PFull3	TTACGCACAAGAGTTCCGTAG	Start at the end of the last exon (Exon3)	Full-length cDNA
PFull4	GGAGATAGTGGGCTCAGAGC	Start at P?:+1 (Fig.4, S4)	Full-length cDNA
Orf-c-Myc1	ATCATATG <u>CTG</u> GATTTTTTCGGG	CTG initiation codon	Full-length Orf-c-Myc1
Orf-c-Myc2	ATCATATG <u>ATG</u> CCCCCAACGTTA	ATG imitation codon	Full-length Orf-c-Myc2
Orf-c-MycS	ATCATATG <u>ATG</u> GTGACCGAGC	ATG imitation codon	Full-length Orf-c-MycS
Orfs	ATCTCGAGTTACGCACAAGAGTTC	TAA stop codon	Reverse for all Orfs

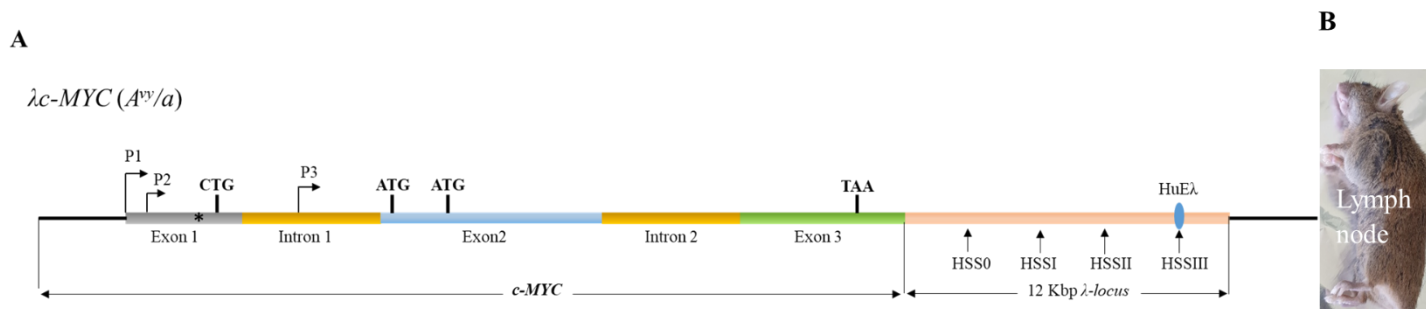


Figure 2: Schematic representation of the structure of the $\lambda c\text{-MYC}$ transgene (A) carried by the $\lambda c\text{-MYC}$ ($A^{vy/a}$) model mouse of Burkitt's lymphoma (B) (Kovalchuk et al. 2000). Note that the diagram is not to scale.

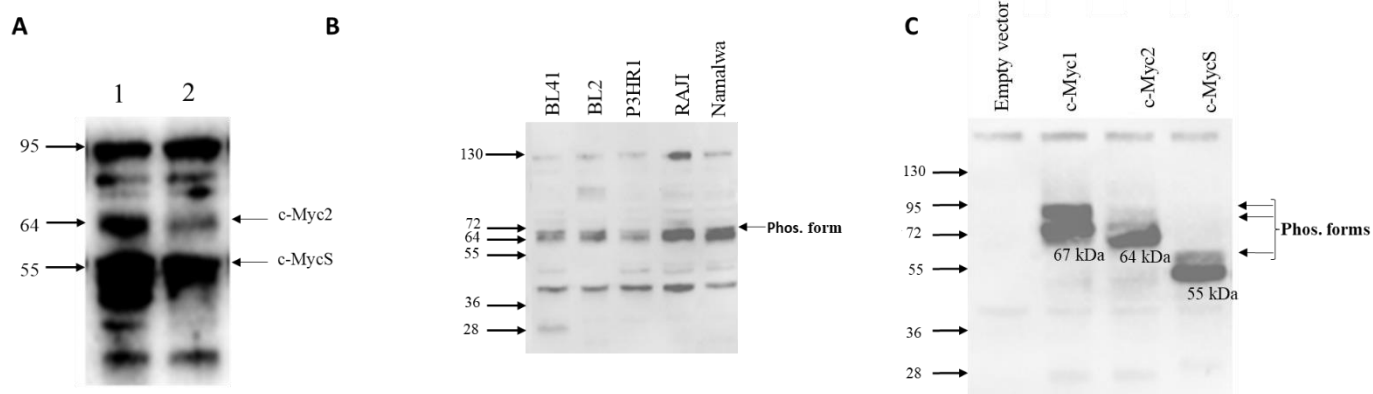


Figure 3: Analysis of the migration profile of c-Myc proteins by western blot using the monoclonal antibody 9E10 directed against the C-terminal part common to c-Myc1, c-Myc2 and c-MycS. (A) Typical result obtained in the case of cell extracts prepared from lymph nodes of two λ c-MYC ($A^{vy/a}$) mice (lane 1, lane 2). (B) Result obtained in the case of extracts prepared from BL cell lines. (C) electrophoretic pattern of c-Myc1, c-Myc2 and c-MycS proteins, obtained in vitro by transcription and translation of the open reading frames (Orf-c-Myc1, Orf-c-Myc2 and Orf-c-MycS) cloned separately into the pT7CFE1 vector (Figure S1). The apparent molecular weight of the different bands were shown on the left; Empty vector: negative control; Phos. form: Phosphorylated form.

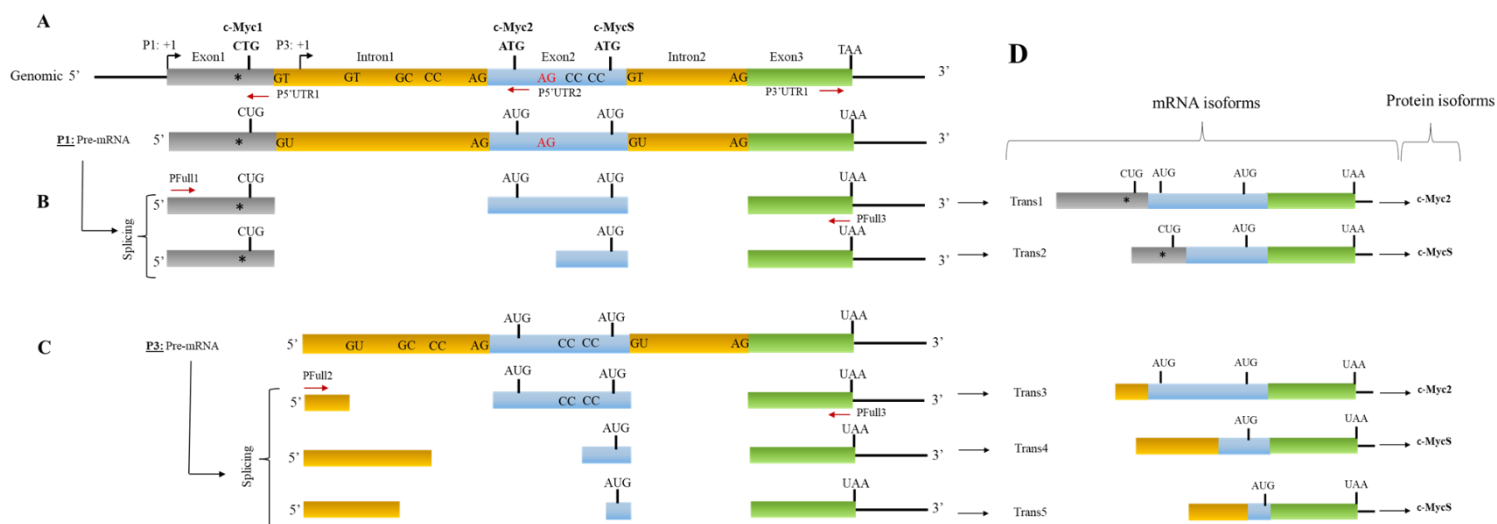


Figure 4: Schematic representation of the different events leading to the genesis of several mRNAs of the c-MYC gene related to the genomic structure. Genomic structure (A) at the origin of the different events (B), (C) and (D). Primers P5'UTR1 and P5'UTR2 used to obtain the 5'UTR; primer P3'UTR1 to obtain the 3'UTR and the other primers are used as indicated to obtain the full-length cDNA. The dinucleotides indicated represent the different splice donor and acceptor sites. The triplets indicate the translation initiation codons to obtain c-Myc1, c-Myc2 or c-MycS. TAA: Translation stop codon. *: PvuII mutation

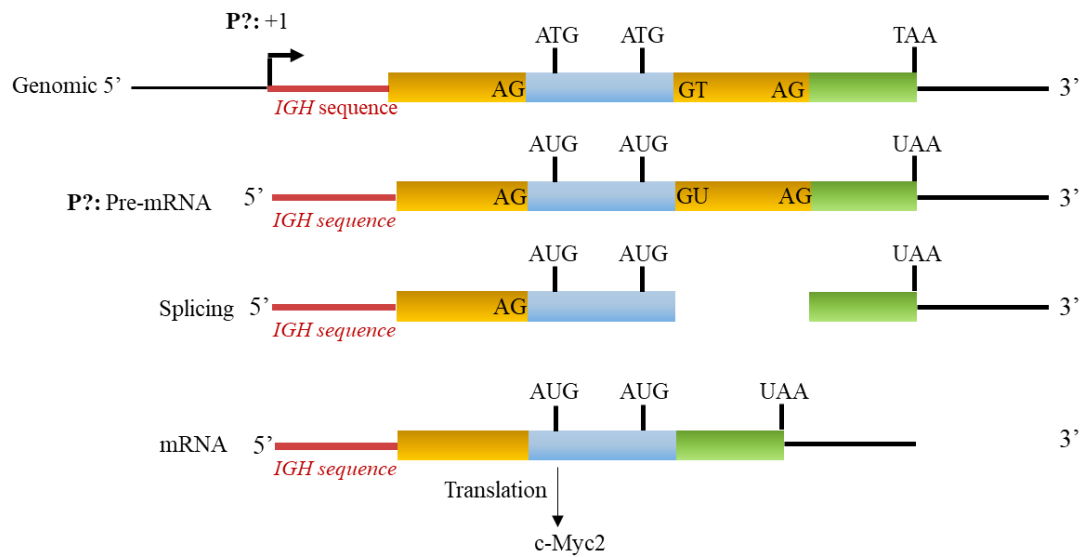


Figure 5: Partial genomic structure of the *c-MYC* gene associated with *t(8;14)* translocation of *BLA1*. The expression from a yet to be determined promoter (*P?*) generates a hybrid mRNA with an IGH sequence. The translation of the resulting mRNA leads to the production of the *c-Myc2* protein.

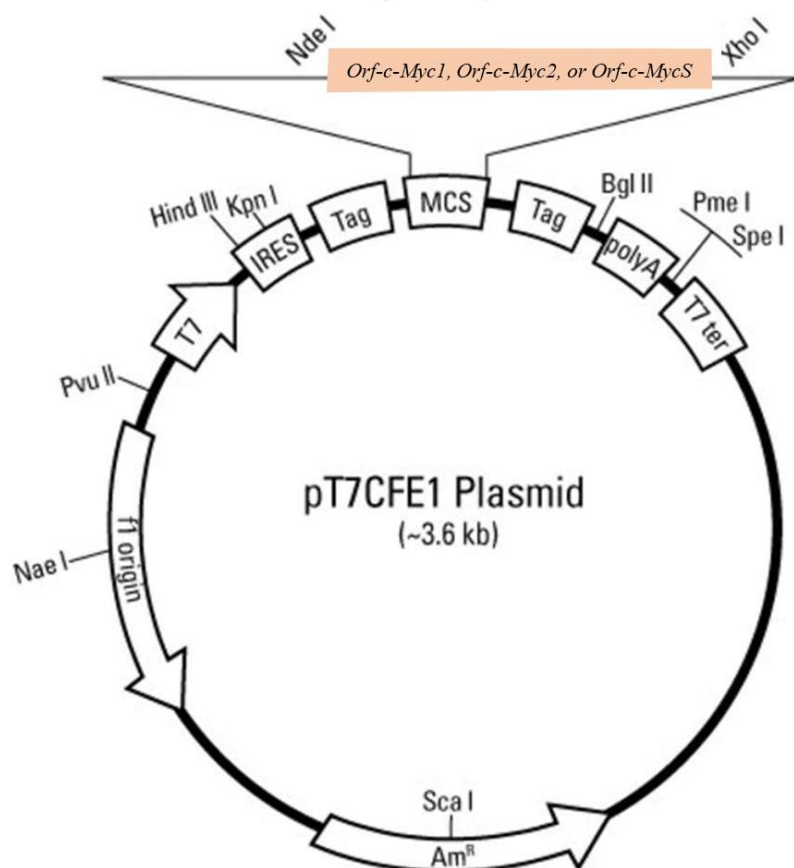


Figure S1: Full-length open reading frames (Orf) encoding c-Myc1, c-Myc2 or c-MycS are cloned into the pT7CFE1 vector subjected to transcription (T7 promoter) and translation using a mammalian *in vitro* translation system based on HeLa cell lysates.

3'RACE

P3'UTR1
→

```
genomic  TAAAGGAAAACGATTCTTCTAACAGAAATGTCCTGAGCAATCACCTATGAACTTGTTTCAAATGCATGATCAAATGCAACCTCACACCTTGGCTGAGTCTTGAGACTGAAAGATTAGC 120
3' UTR1  TAAGGAAAACGATTCTTCTAACAGAAATGTCCTGAGCAATCACCTATGAACTTGTTTCAAATGCATGATCAAATGCAACCTCACACCTTGGCTGAGTCTTGAGACTGAAAGATTAGC
3' UTR2  TAAGGAAAACGATTCTTCTAACAGAAATGTCCTGAGCAATCACCTATGAACTTGTTTCAAATGCATGATCAAATGCAACCTCACACCTTGGCTGAGTCTTGAGACTGAAAGATTAGC

-----/continuation of 3' UTR/-----

genomic  TACACAATGTTTCTCTGTAATAATTGCCATTAATGTAATAACTTTAATAAAAACGTTTATAGCAGTTACACAGAATTTCAATCCTAGTATATAGTACCTAGTATTATAGGTACTATAAA 360
3' UTR1  TACACAATGTTTCTCTGTAATAATTGCCATTAATGTAATAACTTTAATAAAAACGTTTATAGCAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
3' UTR2  TACACAATGTTTCTCTGTAATAATTGCCATTAATGTAATAACTTTAATAAAAACGTTTATAGCAGTTACACAGAATTTCAATCCTAGTATATAGTACCTAGTATTATAGGTACTATAAA 360

genomic  CCCTAATTTTTTTTATTTAAGTACATTTTGCTTTTTAAAGTTGATTTTTTCTATTGTTTTTAGAAAAAATAAAAATAAATACTGGCAAATATATCATTGAGCCAAATCTTAAGTTGTGAATGT 480
3' UTR2  CCCTAATTTTTTTTATTTAAGTACATTTTGCTTTTTAAAGTTGATTTTTTCTATTGTTTTTAGAAAAAATAAAAATAAATACTGGCAAATATATCATTGAGCCAAATCTTAAGTTGTGAATGT → PolyA tail
```

Figure S2: Nucleotide sequences of the identified 3'UTR types. The translational TAA stop codon is indicated. Alternative AATAAA polyadenylation sites are underlined. P3'UTR1: Primer (Table1).

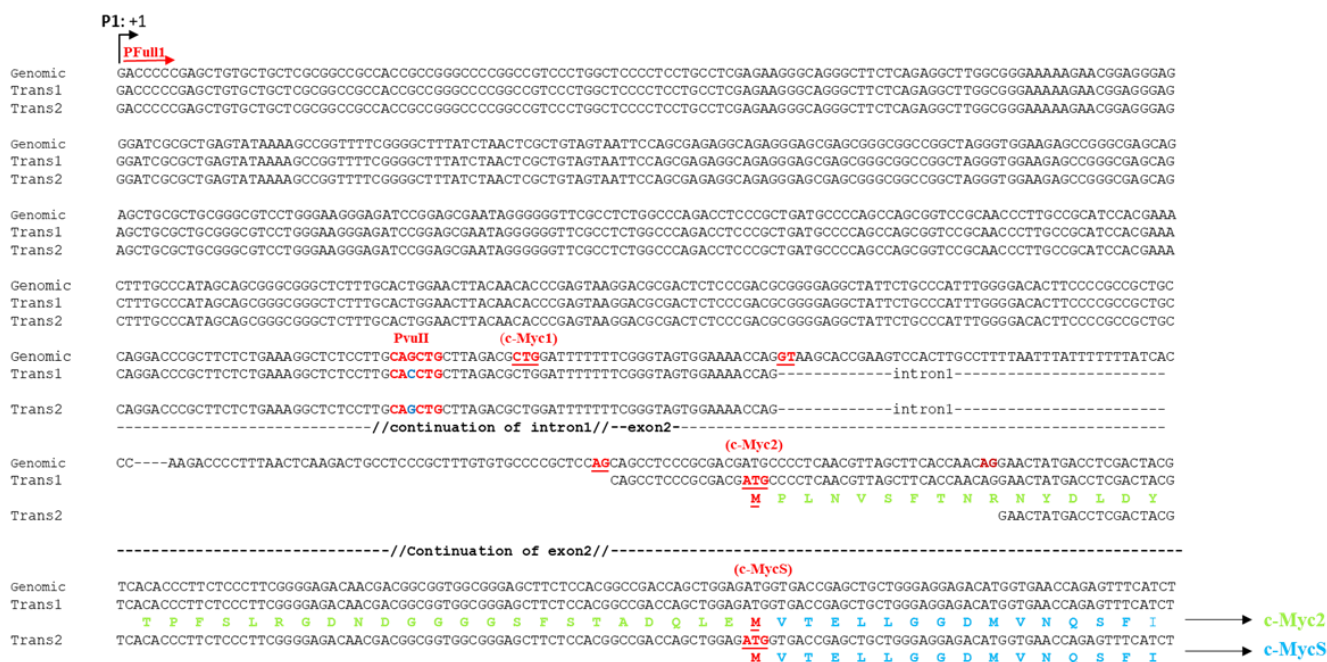


Figure S3: Nucleotide sequences of Trans1 and Trans2 transcripts compared to the corresponding genomic structure. Underlined splice donor (GT), acceptor (AG) sites, and initiation codons (CTG, ATG) are indicated. The first amino acids of c-Myc2 and c-MycS are shown. Translation from CTG of Trans1 is prevented by the PvuII mutation. +1: Transcription initiation site from the P1 promoter. PFull1: Primer (Table1); M: The first amino acid, methionine.

BL41

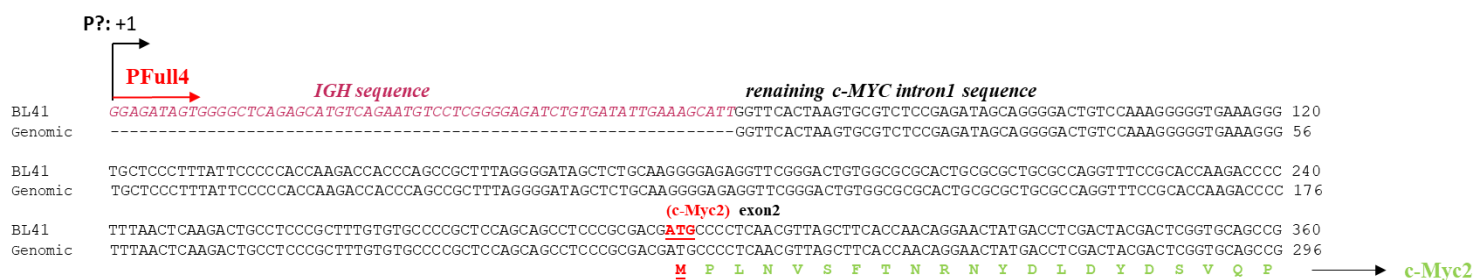


Figure S5: Nucleotide sequences of the only transcript expressed from a yet to be determined promoter (P?). The transcript exhibits an IGH sequence. This transcript encodes c-Myc2. PFull4: primer (Table1); M: methionine, amino acid, methionine.



Chapitre III. Discussion générale/conclusion/ Perspectives



Dans un premier temps de notre travail de thèse, nous avons entrepris une étude visant à la mise en place d'un modèle *in vivo* pour étudier le rôle de la méthylation de *c-MYC* dans la lymphomagenèse B. En effet, des altérations des profils de méthylation de l'ADN, notamment une hypométhylation génomique générale et une hyperméthylation régionale, coexistent dans de nombreux tissus néoplasiques dont les lymphomes. Pour cela nous avons utilisé le modèle murin $\lambda c-MYC$ ($A^{vy/a}$) issue d'un croisement de souris $A^{vy/a}$ avec des $\lambda c-MYC$ qui développent un lymphome de type Burkitt. En effet les souris $A^{vy/a}$ ont la capacité à changer phénotypiquement de couleur de pelage en fonction du taux de méthylation des neuf dinucléotides CpG situés en amont de l'allèle "A" d'*Agouti*. Notre hypothèse était que le phénotype (couleur du pelage) des souris, issus de ces croisements, pouvait servir de bioindicateur de la méthylation de l'épigénome dont celui de *c-MYC*, ce qui permettait aussi d'étudier l'incidence des tumeurs de type Burkitt en fonction de cette méthylation. Si cette hypothèse était vérifiée sur *c-MYC*, il devenait possible d'inverser l'hypométhylation par l'alimentation et d'observer éventuellement une diminution du processus tumoral. En effet, l'expression du gène *Agouti* est également modulée par le régime alimentaire maternel. Pendant la grossesse, une supplémentation en folate, un donneur de groupes méthyle, influence la méthylation de l'élément *IAP* et modifie ensuite le phénotype des descendants

Néanmoins, pour différentes raisons surtout en lien avec la pandémie du COVID19 comme expliqué dans la partie des résultats sur la méthylation, nous n'avons pas pu aller au bout de ce travail et notamment concernant l'étude du degré de méthylation du gène *c-MYC* dans notre modèle. Il est reconnu que l'augmentation du degré de méthylation pourrait réduire l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (hétérochromatine) puis le niveau de l'expression du gène ici *c-MYC*. Cette baisse de l'expression pourrait au moins atténuer l'apparition du lymphome, ce qui était le but recherché. Cependant nos observations préliminaires, et la comparaison du nombre de souris qui ont ou n'ont pas développé de lymphome en fonction du phénotype des souris ne semblent pas mettre en relation dans notre modèle l'hypométhylation (reflétée par la couleur de pelage jaune) et le développement du lymphome de Burkitt. Par ailleurs, le suivi des croisements et les expériences correspondantes ont été suspendus pendant la période de confinement, ce qui a entraîné la perte de la lignée murine. Pour ces raisons, nous avons décidé de ne pas poursuivre ce travail.

Par la suite, nous avons décidé de concentrer nos recherches sur un autre axe qui visait à rechercher d'éventuels variants transcriptionnels dans notre modèle murin de Burkitt et dans les lignées cellulaires humaines de lymphomes B, en lien avec l'expression préférentielle d'isoformes protéiques de *c-Myc*. Ce



travail a permis la rédaction d'un article qui constitue l'essentiel de nos résultats de thèse et que nous allons soumettre prochainement.

Pour cela, nous avons séquencé les transcrits de *c-MYC* à partir d'ARN extraits de ganglions congelés, ou d'ARNm préalablement congelés et extraits à partir de ganglions frais. Comme on le sait, les ARNm sont sensibles et se dégradent rapidement, leur qualité peut donc être affectée par la congélation. Cela pourrait expliquer les difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir des amplifications et souvent pour les cloner. Pour obtenir les amplifications des séquences de la région 5' et 3', nous avons utilisé l'approche 5'RACE et 3'RACE, respectivement. L'approche RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) consiste principalement en une RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) et une PCR pour amplifier les extrémités des transcrits à partir de l'ARNm et de l'ADNc, respectivement. Pour la 5'RACE, les premières amorces PCR ont été conçues à partir de la séquence connue de l'ARNm de *c-MYC* et pour une queue d'oligomères qui a été ajoutée à l'extrémité 3' du premier brin d'ADNc. Une deuxième série d'amorces (nested -PCR), qui s'étendent de l'extrémité inconnue du messenger (5') à la région connue, a été utilisée pour réaliser une PCR nichée qui permet de réduire l'amplification de produits non désirés et ensuite de cloner et séquencer la partie inconnue. A partir du même principe, la région 3' du messenger de *c-MYC* était obtenue. En utilisant cette démarche expérimentale, nous avons identifié, dans les ganglions lymphatiques de souris $\lambda c-MYC$ ($A^{vy/a}$) atteints de lymphome de Burkitt, 5 transcrits du transgène *c-MYC* humain qui ont une hétérogénéité au niveau de l'extrémité 5'. Pour rappel, ces souris portent le gène *c-MYC* humain qui est dérivé de l'allèle transloqué t(8;22) de la lignée cellulaire de lymphome BL60 dans laquelle la protéine c-Myc2 est majoritairement détectée (Stephen R. Hann et al. 1988) (Kovalchuk et al. 2000). Plus précisément, nous avons pu discerner en gel d'agarose 3 bandes issues de l'amplification 5' de l'ADNc et une bande issue de l'amplification 3' sur le gel d'électrophorèse (données non présentées). Les bandes différentes obtenues au niveau de la région 5' mettent en évidence la présence de transcrits de longueur différente. En outre, nous retrouvons les deux signaux de polyadénylation précédemment identifiés dans la région 3' (Laird-Offringa et al. 1989) (article, Supplementary data S5). Par conséquent, nous nous sommes concentrés uniquement sur la séquence de la région 5'.

Dans l'ensemble et pour la région 5'UTR, nos résultats montrent l'identification de transcrits qui ont P1 et P3 comme promoteur (article, Figure 2). Effectivement, dans les cellules cancéreuses, un « shift » P2/P1 (Strobl and Eick 1992) (Strobl et al. 1993) (Hu et al. 2007). De plus, il a été démontré que P3, contrairement à P1 et P2, ne possède pas de boîte TATA et que



les transcrits *c-MYC* initiés à partir de P3 (moins de 5%) sont plus stables que les transcrits normaux dont le promoteur est P1 et P2. (Robert-Lezenes et al. 1987). Les deux transcrits initiaux de P1 conservent les sites d'épissage canoniques (GU et AG). Cependant, l'un d'eux utilise un nouveau site d'épissage accepteur AG situé en aval d'AUG, le codon initiateur de *c-Myc2*. Cet épissage donne lieu à un transcrit plus court qui pourrait produire *in vivo* les protéines *c-Myc1* (la forme plus longue) et *c-MycS*. Toutefois, une mutation proche du site de traduction CUG empêche son utilisation en tant que site d'initiation de la traduction et entraîne une perte de *c-Myc1* (S. R. Hann et al. 1994). En plus de ceux-ci, nous avons trouvé 3 autres transcrits qui ont P3 comme promoteur. De façon surprenante, ils proviennent de l'épissage de la région 5'UTR, mais cette fois en utilisant des sites d'épissage distincts. Nous avons ainsi identifié trois sites d'épissage donneurs GU, CC et CG situés dans l'intron 1 en aval du +1 de transcription de P3 ; et les sites d'épissage accepteurs étaient respectivement AG (un site canonique habituellement utilisé dans les épissages), et deux CC distincts (site d'épissage non-canonique), un dinucléotide situé dans l'exon 2 en aval d'AUG, le codon de départ de *c-Myc2* (article , Figure 2). Tous ces transcrits étaient plus courts que le transcrit P3 de "type sauvage" précédemment décrit mais prédictifs de la production d'au moins deux protéines *c-Myc2* et/ou *c-MycS* (Ro-Choi and Choi 2019). Par ailleurs, une seule publication a décrit l'existence d'un épissage alternatif à l'intérieur de l'intron 1 et codant uniquement pour *c-Myc2* (p64) dans une lignée cellulaire humaine de carcinome (SW613-S) (Bodescot and Brison 1996). Nos résultats semblent montrer que, contrairement à ce qui avait envisagé, le processus d'épissage alternatif pourrait constituer une autre voie de variabilité des transcrits ; cependant, comme nous l'avons constaté sur l'étude protéique, cela ne génère pas de nouvelles isoformes protéiques.

Ainsi, sur le plan protéique, contrairement à ce qui avait été démontré pour les cellules BL60 indiquant une expression de *c-Myc2* (p64) (Stephen R. Hann et al. 1988), l'analyse par western blot des protéines extraites des tumeurs des ganglions lymphatiques de nos souris a permis la détection, par un anticorps monoclonal anti-*c-Myc* (9E10), de plusieurs bandes dont certaines se sont avérées finalement non spécifiques. En effet, pour vérifier la spécificité de l'anticorps monoclonal anti-*c-Myc* utilisé, nous avons recouru à une traduction *in vitro* médiée par l'IRES de l'EMCV dans un lysat de cellules HeLa. Nous avons alors cloné dans un plasmide pT7CEF1 les trois cadres de lecture ouverts de *c-MYC*. En parallèle, nous avons créé avec le même plasmide, deux constructions qui produisent les protéines *c-Myc1* et *c-MycS* marquées à l'histidine, avec un contrôle positif, pT7CEF-GFP marquée à l'histidine (offert dans le kit) (données non présentées dans l'article). La détection de bandes ayant la même masse



moléculaire apparente par deux anticorps monoclonaux distincts confirme, *in fine*, la fiabilité de l'anticorps 9E10 à détecter les différentes isoformes de c-Myc. Nous montrons ainsi, après confirmation des bandes de c-Myc par ce modèle de traduction *in vitro*, l'expression d'une bande correspondant à c-MycS (p55) en plus de la bande correspondante à c-Myc2 (p64). (article, Figure 1) Cette observation semble conforter les résultats que nous avons obtenus concernant les transcrits identifiés dans les mêmes échantillons murins.

Globalement, à partir de tous les transcrits que nous avons détectés, aucune nouvelle protéine c-Myc n'a été suggérée d'être produite, ou du moins qu'un codon d'initiation non-canonique pourrait être utilisé (article, Supplementary data S3). Les isoformes protéiques qui pourraient être produites à partir d'un codon d'initiation alternatif non canonique, situé en amont du codon d'initiation de c-Myc2, auraient une région N-terminale plus longue que celle de la protéine c-Myc2 (toujours plus courte que la longueur de la région N-terminale de c-Myc1). Cette extension de la terminaison N-terminale pourrait changer la fonction de la protéine. C'est exactement ce qui était démontré pour les isoformes protéiques connues qui diffèrent par cette région. Plus précisément, le choix du codon de départ dépend de l'état de la cellule, mais aussi du promoteur utilisé. L'initiation de la traduction de *c-MYC* au codon de départ CUG en amont du cadre de lecture ouvert (ORF) normal code pour c-Myc1 (453aa) préférentiellement produite dans les cellules en confluence. Alors que la protéine c-Myc2 (439aa) initiée à partir du premier AUG est exprimée de manière constitutive et explicite dans les cellules cancéreuses (Hann, Sloan-Brown, and Spotts 1992). Malgré leurs fonctions différentes, ces deux isoformes partagent les mêmes boîtes d'homologie (Figure 3, Introduction). Pourtant, l'isoforme la plus courte, c-MycS (339aa), est détectée dans certaines cellules tumorales. Même avec la délétion de la boîte d'homologie MBI (résidus 47 à 62) requise pour la transactivation des gènes cibles et la liaison à l'E-box, c-MycS (phosphoprotéine) conserve de nombreuses caractéristiques de c-Myc telles l'interaction avec MAX via HLH-LZ, l'induction de la prolifération et l'apoptose, sa localisation nucléaire, et sa demi-vie de 30 mins (Spotts et al. 1997) (Xiao et al. 1998) (L. Chen et al. 2000) (Jensen et al. 2003). Il découle de ce qui précède que les cellules de lymphome B, dans lesquelles le gène *c-MYC* est dérégulé, produiraient des transcrits analogues ou distincts pour assurer une production permanente et élevée de la protéine c-Myc et ainsi une prolifération accrue. Par suite, en utilisant la même approche 5'RACE pour amplifier la région 5', nous avons détecté dans la lignée cellulaire BL41- (t(8;14)), un transcrit hybride unique (article Figures 2 C et supplementary data S4) qui pourrait coder pour c-Myc2. Quant au profil protéique obtenu par western blot, nous avons détecté, avec le même anticorps monoclonal (9E10), dans les 5



cellules de lymphome de Burkitt (article, Figure 1b) mais aussi dans 4 lignées cellulaires de DLBCL (données non montrées), un profil similaire constitué d'une double bande correspondant à c-Myc2 et sans doute à sa forme phosphorylée. Par conséquent, nous pourrions considérer qu'un profil protéique dans lequel l'isoforme c-Myc2 (et sa forme phosphorylée) est détectée de manière préférentielle, pourrait caractériser l'isoforme de c-Myc exprimée dans les lignées de lymphome B.

Concernant les mécanismes impliqués dans la traduction des transcrits dans nos modèles expérimentaux de Burkitt notamment, nous avons précédemment mentionné (Introduction bibliographique) deux mécanismes de synthèse de la protéine c-Myc d'une fréquence différente selon le contexte cellulaire. Dans les conditions favorables, le mécanisme de balayage dépendant de la coiffe 5' est dominant. Au contraire, dans des conditions défavorables, un mécanisme alternatif dénommé mécanisme IRES-dépendant permet d'exprimer c-Myc, notamment en condition d'apoptose ou lors de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) (Cencig et al. 2004) (Shi et al. 2016). Des études ont montré que l'efficacité de l'IRES *c-MYC* est 5 fois plus grande que celle de l'IRES EMCV (Stoneley, Subkhankulova, et al. 2000) (L. Créancier et al. 2001). De plus, les IRES *c-MYC* et de l'EMCV sont activés dans le lysat de HeLa utilisé dans notre modèle de traduction *in vitro* permettant d'envisager la possibilité d'un mécanisme IRES dépendant (Thoma et al. 2004) (Laura C. Cobbold et al. 2008). Cependant, bien que dans notre modèle d'étude *in vitro* de la traduction, où les conditions de culture n'étaient pas apoptotiques, il est peu probable que ce mécanisme ait été utilisé, il nous est pas possible de déterminer si les transcrits obtenus sont traduits selon un mécanisme cap-dépendant ou cap-indépendant.

En guise de conclusion, nos travaux mettent en évidence un mécanisme alternatif adopté par les cellules de lymphome B, plus précisément les lymphomes de type Burkitt, pour générer des variants transcriptionnels potentiels permettant de coder les mêmes isoformes protéiques de c-Myc, assurant un maintien de l'expression de c-Myc, vitale pour ces cellules tumorales. Sachant que l'épissage alternatif est un mécanisme de régulation bien établi pour l'expression des gènes, et que la longueur du messager affecte sa traductibilité et sa stabilité il serait intéressant d'analyser et d'identifier les acteurs qui régulent ces processus d'épissage des transcrits de *c-MYC*. Cela permettra de mieux comprendre la pertinence de ces transcrits dans le processus de tumorigenèse B. En revanche, nos travaux ont porté sur des variants des messagers de *c-MYC* dans un contexte murin, qui pourraient ne pas être présents dans les



spécimens provenant de patients atteints de lymphomes. Il est clair que la prochaine étape vise à confirmer la présence possible de variants de transcrits *c-MYC* chez les patients. Ainsi, un séquençage par nanopores de la région 5' des transcrits *c-MYC* exprimés dans diverses lignées cellulaires humaines de lymphomes B dont le gène *c-MYC* est dérégulé est en cours. Il nous permettra de rechercher la présence de ces variants transcriptionnels dans ces lignées humaines avant de démarrer l'étude sur les biopsies de patients atteints de Burkitt ou de DLBCL par exemple. D'autre part, le gène *c-MYC* est également dérégulé dans de nombreux types de cancer, l'étude des messagers alternatifs pourrait être élargie à ces cancers pour mieux comprendre l'implication de l'oncogénèse de *c-MYC* dans les tumeurs solides comme le cancer de sein, le cancer du colon... De plus, *c-MycS* étant l'une des protéines prédites, il serait intéressant de générer un modèle transgénique permettant d'investir le rôle de *c-MycS* dans la lymphomagenèse. En conclusion, ces résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression de *c-MYC* dans la lymphomagenèse de Burkitt.

En outre, ce travail et plus globalement les travaux de notre équipe mais aussi d'autres équipes confirment qu'une expression aberrante de *c-Myc* est observée dans un large éventail de cancers humains ; cette expression a été liée à presque tous les aspects du processus oncogénique, comme l'orchestration de la croissance et de la prolifération tumorales incontrôlées, l'immortalisation, l'échappement à la surveillance immunitaire et la résistance aux traitements. Ces données suggèrent que le ciblage de *c-MYC* pourrait être une approche efficace pour traiter certains cancers humains.

Parmi les multiples stratégies actuellement explorées pour cibler les tumeurs dirigées par *c-MYC*, la majorité utilise des approches indirectes comme celle basée sur l'inhibition des gènes létaux induits par *c-MYC*, ou interfère avec l'expression de *c-MYC* au niveau de l'ADN, de l'ARN ou des protéines. Les stratégies directes d'inhibition de *c-MYC* comprennent des approches utilisant de petites molécules, des peptides, pour inhiber la dimérisation de *c-Myc-MAX*, séquestrer *MAX* via la stabilisation de l'homodimère, ou interférer avec la liaison de *c-Myc-MAX* à des séquences d'ADN cibles. Cependant, à ce jour, aucun médicament n'a démontré une efficacité thérapeutique.

L'état actuel dans ce domaine nous encourage à continuer d'essayer de développer d'autres stratégies et méthodes non encore explorées, ou celles déjà explorées mais que nous aborderons différemment. En effet, le terme expression aberrante de *c-Myc* évoqué ci-dessus reflète presque autant de situations différentes (surexpression, translocation, mutation, épissages



alternatifs etc...) que de types de cancers décrits impliquant c-Myc. Néanmoins peu de travaux se sont réellement intéressés aux produits du gène *c-MYC* : les isoformes protéiques de c-Myc. Nous pensons que quelque soit le mécanisme transcriptionnel impliqué, il conduira à une réduction de la protéine c-Myc1 au détriment de c-Myc2 et c-MycS. Ainsi nous envisageons de continuer nos travaux pour disposer de données qui conforteront indiscutablement cette hypothèse. En particulier, les résultats qui seront obtenus à partir des tumeurs humaines de lymphomes B, en relation avec l'expression des transcrits et des isoformes protéiques de c-Myc pourraient déboucher sur de nouveaux outils thérapeutiques comme l'immunothérapie et/ou oligonucléotides antisens.



Références



- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai. 2020. "Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique." In *Shiv Pillai*, 6th ed., 366. Elsevier Masson. <https://www.elsevier-masson.fr/les-bases-de-limmunologie-fondamentale-et-clinique-9782294771019.html>.
- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1985. "The C-Myc Oncogene Driven by Immunoglobulin Enhancers Induces Lymphoid Malignancy in Transgenic Mice." *Nature* 318 (6046): 533–38. <https://doi.org/10.1038/318533a0>.
- Ahmadi, Seyed Esmaeil, Samira Rahimi, Bahman Zarandi, Rouzbeh Chegeni, and Majid Safa. 2021. "MYC: A Multipurpose Oncogene with Prognostic and Therapeutic Implications in Blood Malignancies." *Journal of Hematology & Oncology* 14 (1): 121. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01111-4>.
- Aitamer, Marine. 2020. "Etude de La Production de Petites Vésicules Extracellulaires (Dont Les Exosomes) Dans Les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL), Influence de La Voie BDNF/TrkB et Impact Sur La Sensibilité Des Cellules Tumorales Aux Anti-CD20." These de doctorat, Limoges. <http://www.theses.fr/2020LIMO0044>.
- Albert, T., J. Wells, J. O. Funk, A. Pullner, E. E. Raschke, G. Stelzer, M. Meisterernst, P. J. Farnham, and D. Eick. 2001. "The Chromatin Structure of the Dual C-Myc Promoter P1/P2 Is Regulated by Separate Elements." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20482–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100265200>.
- Alboran, Ignacio Moreno de, Rónán C. O'Hagan, Frank Gärtner, Barbara Malynn, Laurie Davidson, Robert Rickert, Klaus Rajewsky, Ronald A. DePinho, and Frederick W. Alt. 2001. "Analysis of C-MYC Function in Normal Cells via Conditional Gene-Targeted Mutation." *Immunity* 14 (1): 45–55. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00088-7).
- Alex, R., O. Sözeri, S. Meyer, and R. Dildrop. 1992. "Determination of the DNA Sequence Recognized by the BHLH-Zip Domain of the N-Myc Protein." *Nucleic Acids Research* 20 (9): 2257–63. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2257>.
- Alitalo, K., M. Schwab, C. C. Lin, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1983. "Homogeneously Staining Chromosomal Regions Contain Amplified Copies of an Abundantly Expressed Cellular Oncogene (c-Myc) in Malignant Neuroendocrine Cells from a Human Colon Carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (6): 1707–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1707>.
- Alizadeh, Ash A., Michael B. Eisen, R. Eric Davis, Chi Ma, Izidore S. Lossos, Andreas Rosenwald, Jennifer C. Boldrick, et al. 2000. "Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling." *Nature* 403 (6769): 503–11. <https://doi.org/10.1038/35000501>.
- Allevato, Michael, Eugene Bolotin, Mark Grossman, Daniel Mane-Padros, Frances M. Sladek, and Ernest Martinez. 2017. "Sequence-Specific DNA Binding by MYC/MAX to Low-Affinity Non-E-Box Motifs." Edited by Finbarr Hayes. *PLOS ONE* 12 (7): e0180147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180147>.
- Almeida, Sérgio F. de, and Maria Carmo-Fonseca. 2008. "The CTD Role in Cotranscriptional RNA Processing and Surveillance." *FEBS Letters*, Nuclear Dynamics and Cytoskeleton Signaling, 582 (14): 1971–76. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.019>.
- Amanullah, Arshad, Dan A. Liebermann, and Barbara Hoffman. 2000. "P53-Independent Apoptosis Associated with c-Myc-Mediated Block in Myeloid Cell Differentiation." *Oncogene* 19 (26): 2967–77. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203638>.
- Amin, Rada, Abdelghafour Marfak, Céline Pangault, Christelle Oblet, Aurélie Chanut, Karin Tarte, Yves Denizot, and Michel Cogné. 2014. "The Class-Specific BCR Tonic Signal Modulates Lymphomagenesis in a c-Myc Deregulation Transgenic Model." *Oncotarget* 5 (19): 8995–9006.
- Anderson, Sarah, Kumud Raj Poudel, Minna Roh-Johnson, Thomas Brabletz, Ming Yu, Nofit Borenstein-Auerbach, William N. Grady, et al. 2016. "MYC-Nick Promotes Cell Migration by



- Inducing Fascin Expression and Cdc42 Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (37): E5481-5490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610994113>.
- Andresen, Cecilia, Sara Helander, Alexander Lemak, Christophe Farès, Veronika Csizmok, Jonas Carlsson, Linda Z. Penn, et al. 2012. "Transient Structure and Dynamics in the Disordered C-Myc Transactivation Domain Affect Bin1 Binding." *Nucleic Acids Research* 40 (13): 6353–66. <https://doi.org/10.1093/nar/gks263>.
- Arabi, Azadeh, Siqin Wu, Karin Ridderstråle, Holger Bierhoff, Chiounan Shiue, Karoly Fatyol, Sara Fahlén, et al. 2005. "C-Myc Associates with Ribosomal DNA and Activates RNA Polymerase I Transcription." *Nature Cell Biology* 7 (3): 303–10. <https://doi.org/10.1038/ncb1225>.
- Arnold, Hugh K, Xiaoli Zhang, Colin J Daniel, Deanne Tibbitts, Julie Escamilla-Powers, Amy Farrell, Sara Tokarz, Charlie Morgan, and Rosalie C Sears. 2009. "The Axin1 Scaffold Protein Promotes Formation of a Degradation Complex for C-Myc." *The EMBO Journal* 28 (5): 500–512. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.279>.
- Askew, D. S., R. A. Ashmun, B. C. Simmons, and J. L. Cleveland. 1991. "Constitutive C-Myc Expression in an IL-3-Dependent Myeloid Cell Line Suppresses Cell Cycle Arrest and Accelerates Apoptosis." *Oncogene* 6 (10): 1915–22.
- Askew, D. S., J. N. Ihle, and J. L. Cleveland. 1993. "Activation of Apoptosis Associated with Enforced Myc Expression in Myeloid Progenitor Cells Is Dominant to the Suppression of Apoptosis by Interleukin-3 or Erythropoietin." *Blood* 82 (7): 2079–87.
- Barrans, Sharon, Simon Crouch, Alex Smith, Kathryn Turner, Roger Owen, Russell Patmore, Eve Roman, and Andrew Jack. 2010. "Rearrangement of MYC Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated in the Era of Rituximab." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (20): 3360–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3947>.
- Barry, Kathryn Hughes, Kareshma Mohanty, Patricia A. Erickson, Difei Wang, Jianxin Shi, Gary Rose, Ashley Cellini, et al. 2020. "MYC DNA Methylation in Prostate Tumor Tissue Is Associated with Gleason Score." *Genes* 12 (1): E12. <https://doi.org/10.3390/genes12010012>.
- Basso, Katia, and Riccardo Dalla-Favera. 2010. "BCL6: Master Regulator of the Germinal Center Reaction and Key Oncogene in B Cell Lymphomagenesis." *Advances in Immunology* 105: 193–210. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05007-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05007-8).
- Baudino, Troy A., Catriona McKay, Helene Pendeville-Samain, Jonas A. Nilsson, Kirsteen H. Maclean, Elsie L. White, Ann C. Davis, James N. Ihle, and John L. Cleveland. 2002. "C-Myc Is Essential for Vasculogenesis and Angiogenesis during Development and Tumor Progression." *Genes & Development* 16 (19): 2530–43. <https://doi.org/10.1101/gad.1024602>.
- Beaudoing, Emmanuel, Susan Freier, Jacqueline R. Wyatt, Jean-Michel Claverie, and Daniel Gautheret. 2000. "Patterns of Variant Polyadenylation Signal Usage in Human Genes." *Genome Research* 10 (7): 1001–10.
- Beaulieu, Marie-Eve, Francisco Castillo, and Laura Soucek. 2020. "Structural and Biophysical Insights into the Function of the Intrinsically Disordered Myc Oncoprotein." *Cells* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/cells9041038>.
- Bédard, Mikaël, Loïka Maltais, Martin Montagne, and Pierre Lavigne. 2017. "Miz-1 and Max Compete to Engage c-Myc: Implication for the Mechanism of Inhibition of c-Myc Transcriptional Activity by Miz-1." *Proteins* 85 (2): 199–206. <https://doi.org/10.1002/prot.25214>.
- Bell, S. P., R. M. Learned, H. M. Jantzen, and R. Tjian. 1988. "Functional Cooperativity between Transcription Factors UBF1 and SL1 Mediates Human Ribosomal RNA Synthesis." *Science (New York, N.Y.)* 241 (4870): 1192–97. <https://doi.org/10.1126/science.3413483>.
- Bello-Fernandez, C., G. Packham, and J. L. Cleveland. 1993. "The Ornithine Decarboxylase Gene Is a Transcriptional Target of C-Myc." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (16): 7804–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7804>.
- Bennett, M. R., G. I. Evan, and A. C. Newby. 1994. "Deregulated Expression of the C-Myc Oncogene Abolishes Inhibition of Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells by Serum



- Reduction, Interferon-Gamma, Heparin, and Cyclic Nucleotide Analogues and Induces Apoptosis." *Circulation Research* 74 (3): 525–36. <https://doi.org/10.1161/01.res.74.3.525>.
- Bentley, D L, and M Groudine. 1986. "Novel Promoter Upstream of the Human C-Myc Gene and Regulation of c-Myc Expression in B-Cell Lymphomas." *Molecular and Cellular Biology* 6 (10): 3481–89.
- Bernard, O, S Cory, S Gerondakis, E Webb, and J M Adams. 1983. "Sequence of the Murine and Human Cellular Myc Oncogenes and Two Modes of Myc Transcription Resulting from Chromosome Translocation in B Lymphoid Tumours." *The EMBO Journal* 2 (12): 2375–83.
- Bhat, Mamatha, Nathaniel Robichaud, Laura Hulea, Nahum Sonenberg, Jerry Pelletier, and Ivan Topisirovic. 2015. "Targeting the Translation Machinery in Cancer." *Nature Reviews. Drug Discovery* 14 (4): 261–78. <https://doi.org/10.1038/nrd4505>.
- Bhatia, K., K. Huppi, G. Spangler, D. Siwarski, R. Iyer, and I. Magrath. 1993. "Point Mutations in the c-Myc Transactivation Domain Are Common in Burkitt's Lymphoma and Mouse Plasmacytomas." *Nature Genetics* 5 (1): 56–61. <https://doi.org/10.1038/ng0993-56>.
- Biegging, Kathryn T., Alexandra C. Amick, and Richard Longnecker. 2009. "Epstein-Barr Virus LMP2A Bypasses P53 Inactivation in a MYC Model of Lymphomagenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (42): 17945–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907994106>.
- Bissonnette, R. P., F. Echeverri, A. Mahboubi, and D. R. Green. 1992. "Apoptotic Cell Death Induced by C-Myc Is Inhibited by Bcl-2." *Nature* 359 (6395): 552–54. <https://doi.org/10.1038/359552a0>.
- Blackwell, T. K., L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman, and H. Weintraub. 1990. "Sequence-Specific DNA Binding by the c-Myc Protein." *Science (New York, N.Y.)* 250 (4984): 1149–51. <https://doi.org/10.1126/science.2251503>.
- Blackwood, E. M., and R. N. Eisenman. 1991. "Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc." *Science (New York, N.Y.)* 251 (4998): 1211–17. <https://doi.org/10.1126/science.2006410>.
- Blin, Juliana, and Emiliano P. Ricci. 2016. "Le profilage ribosomique - Une technique nouvelle génération pour l'étude de la traduction au cours d'une infection virale." *médecine/sciences* 32 (10): 849–60. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163210018>.
- Blum, Kristie A., Gerard Lozanski, and John C. Byrd. 2004. "Adult Burkitt Leukemia and Lymphoma." *Blood* 104 (10): 3009–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0405>.
- Bodescot, M., and O. Brison. 1996. "Characterization of New Human C-Myc mRNA Species Produced by Alternative Splicing." *Gene* 174 (1): 115–20. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00464-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00464-7).
- Bott, Alex J., I.-Chen Peng, Yongjun Fan, Brandon Faubert, Lu Zhao, Jinyu Li, Sarah Neidler, et al. 2015. "Oncogenic Myc Induces Expression of Glutamine Synthetase through Promoter Demethylation." *Cell Metabolism* 22 (6): 1068–77. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.025>.
- Bouchard, Caroline, Soyoung Lee, Viola Paulus-Hock, Christoph Loddenkemper, Martin Eilers, and Clemens A. Schmitt. 2007. "FoxO Transcription Factors Suppress Myc-Driven Lymphomagenesis via Direct Activation of Arf." *Genes & Development* 21 (21): 2775–87. <https://doi.org/10.1101/gad.453107>.
- Boxer, L. M., and C. V. Dang. 2001. "Translocations Involving C-Myc and c-Myc Function." *Oncogene* 20 (40): 5595–5610. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204595>.
- Brady, G., G. J. MacArthur, and P. J. Farrell. 2008. "Epstein-Barr Virus and Burkitt Lymphoma." *Postgraduate Medical Journal* 84 (993): 372–77. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.047977>.
- Breit, S., and M. Schwab. 1989. "Suppression of MYC by High Expression of NMYC in Human Neuroblastoma Cells." *Journal of Neuroscience Research* 24 (1): 21–28. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240105>.
- Brenner, Carmen, Rachel Deplus, Céline Didelot, Axelle Lorient, Emmanuelle Viré, Charles De Smet, Arantxa Gutierrez, et al. 2005. "Myc Represses Transcription through Recruitment of DNA



- Methyltransferase Corepressor." *The EMBO Journal* 24 (2): 336–46.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600509>.
- Bretones, Gabriel, M. Dolores Delgado, and Javier León. 2015. "Myc and Cell Cycle Control." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1849 (5): 506–16.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>.
- Brooks, Tracy A., and Laurence H. Hurley. 2009. "The Role of Supercoiling in Transcriptional Control of MYC and Its Importance in Molecular Therapeutics." *Nature Reviews Cancer* 9 (12): 849–61.
<https://doi.org/10.1038/nrc2733>.
- Broome, H E, J C Reed, E P Godillot, and R G Hoover. 1987. "Differential Promoter Utilization by the C-Myc Gene in Mitogen- and Interleukin-2-Stimulated Human Lymphocytes." *Molecular and Cellular Biology* 7 (8): 2988–93.
- Cai, Qingqing, L. Jeffrey Medeiros, Xiaolu Xu, and Ken H. Young. 2015. "MYC-Driven Aggressive B-Cell Lymphomas: Biology, Entity, Differential Diagnosis and Clinical Management." *Oncotarget* 6 (36): 38591–616.
- Campanero, M. R., M. I. Armstrong, and E. K. Flemington. 2000. "CpG Methylation as a Mechanism for the Regulation of E2F Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6481–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.100340697>.
- Campbell, Kirsteen J., and Robert J. White. 2014. "MYC Regulation of Cell Growth through Control of Transcription by RNA Polymerases I and III." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (5): a018408. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018408>.
- Carter, Peggy Sue, Marta Jarquin-Pardo, and Arrigo De Benedetti. 1999. "Differential Expression of Myc1 and Myc2 Isoforms in Cells Transformed by EIF4E: Evidence for Internal Ribosome Repositioning in the Human c-Myc 5'UTR." *Oncogene* 18 (30): 4326–35.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202890>.
- Cartwright, Peter, Cameron McLean, Allan Sheppard, Duane Rivett, Karen Jones, and Stephen Dalton. 2005. "LIF/STAT3 Controls ES Cell Self-Renewal and Pluripotency by a Myc-Dependent Mechanism." *Development* 132 (5): 885–96. <https://doi.org/10.1242/dev.01670>.
- Castell, Alina, and Lars-Gunnar Larsson. 2015. "Targeting MYC Translation in Colorectal Cancer." *Cancer Discovery* 5 (7): 701–3. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0660>.
- Cencig, Sabrina, Cécile Nanbru, Shu-Yun Le, Cyril Gueydan, Georges Huez, and Véronique Krusys. 2004. "Mapping and Characterization of the Minimal Internal Ribosome Entry Segment in the Human C-Myc mRNA 5' Untranslated Region." *Oncogene* 23 (1): 267–77.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207017>.
- Chakraborty, Abhishek A., Claudio Scuoppo, Soumyadeep Dey, Lance R. Thomas, Shelly L. Lorey, Scott W. Lowe, and William P. Tansey. 2015. "A Common Functional Consequence of Tumor-Derived Mutations within c-MYC." *Oncogene* 34 (18): 2406–9.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.186>.
- Chang, D. W., G. F. Claassen, S. R. Hann, and M. D. Cole. 2000. "The C-Myc Transactivation Domain Is a Direct Modulator of Apoptotic versus Proliferative Signals." *Molecular and Cellular Biology* 20 (12): 4309–19. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.12.4309-4319.2000>.
- Chanvorachote, Pithi, Nicharat Sriratanasak, and Nongyao Nonpanya. 2020. "C-Myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target." *Anticancer Research* 40 (2): 609–18. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13990>.
- Chavez, Julio C., Christina Bachmeier, and Mohamed A. Kharfan-Dabaja. 2019. "CAR T-Cell Therapy for B-Cell Lymphomas: Clinical Trial Results of Available Products." *Therapeutic Advances in Hematology* 10: 2040620719841581. <https://doi.org/10.1177/2040620719841581>.
- Cheah, M. S., C. D. Wallace, and R. M. Hoffman. 1984. "Hypomethylation of DNA in Human Cancer Cells: A Site-Specific Change in the c-Myc Oncogene." *Journal of the National Cancer Institute* 73 (5): 1057–65.
- Chen, Hui, Hudan Liu, and Guoliang Qing. 2018. "Targeting Oncogenic Myc as a Strategy for Cancer Treatment." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3 (1): 1–7.
<https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>.



- Chen, L., L. Smith, M. A. Accavitti-Loper, S. Omura, and J. Bingham Smith. 2000. "Ubiquitylation and Destruction of Endogenous C-MycS by the Proteasome: Are Myc Boxes Dispensable?" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374 (2): 306–12. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1603>.
- Chettiankandy, Tabita Joy, Jagdish Vishnu Tupkari, Keshav Kumar, and Manisha Sandeep Ahire. 2016. "B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with Features Intermediate between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Classical Burkitt's Lymphoma: A Case Report and Review." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 20 (2): 333. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.185936>.
- Cheung, Hoi-Hung, Tin-Lap Lee, Owen M. Rennert, and Wai-Yee Chan. 2009. "DNA Methylation of Cancer Genome." *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews* 87 (4): 335–50. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20163>.
- Cheung, Wan Cheung, Joong Su Kim, Michael Linden, Liangping Peng, Brian Van Ness, Roberto D. Polakiewicz, and Siegfried Janz. 2004. "Novel Targeted Deregulation of C-Myc Cooperates with Bcl-X(L) to Cause Plasma Cell Neoplasms in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (12): 1763–73. <https://doi.org/10.1172/JCI20369>.
- Chiappella, Annalisa, Alessia Castellino, Maura Nicolosi, Elisa Santambrogio, and Umberto Vitolo. 2017. "Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Elderly: Standard Treatment and New Perspectives." *Expert Review of Hematology* 10 (4): 289–97. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1305264>.
- Chiarle, Roberto, Yan Fan, Roberto Piva, Hugo Boggino, Jeffrey Skolnik, Domenico Novero, Giorgio Palestro, et al. 2002. "S-Phase Kinase-Associated Protein 2 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma Inversely Correlates with P27 Expression and Defines Cells in S Phase." *The American Journal of Pathology* 160 (4): 1457–66. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62571-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62571-0).
- Chong, Lauren C., Susana Ben-Neriah, Graham W. Slack, Ciara Freeman, Daisuke Ennishi, Anja Mottok, Brett Collinge, et al. 2018. "High-Resolution Architecture and Partner Genes of MYC Rearrangements in Lymphoma with DLBCL Morphology." *Blood Advances* 2 (20): 2755–65. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023572>.
- Chung, Hye-Jung, Juhong Liu, Miroslav Dundr, Zuqin Nie, Suzanne Sanford, and David Levens. 2006. "FBPs Are Calibrated Molecular Tools to Adjust Gene Expression." *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6584–97. <https://doi.org/10.1128/MCB.00754-06>.
- Claassen, G. F., and S. R. Hann. 1999. "Myc-Mediated Transformation: The Repression Connection." *Oncogene* 18 (19): 2925–33. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202747>.
- Cobbold, L. C., L. A. Wilson, K. Sawicka, H. A. King, A. V. Kondrashov, K. A. Spriggs, M. Bushell, and A. E. Willis. 2010. "Upregulated C-Myc Expression in Multiple Myeloma by Internal Ribosome Entry Results from Increased Interactions with and Expression of PTB-1 and YB-1." *Oncogene* 29 (19): 2884–91. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.31>.
- Cobbold, Laura C., Keith A. Spriggs, Stephen J. Haines, Helen C. Dobbyn, Christopher Hayes, Cornelia H. de Moor, Kathryn S. Lilley, Martin Bushell, and Anne E. Willis. 2008. "Identification of Internal Ribosome Entry Segment (IRES)-Trans-Acting Factors for the Myc Family of IRESs." *Molecular and Cellular Biology* 28 (1): 40–49. <https://doi.org/10.1128/MCB.01298-07>.
- Coiffier, Bertrand, and Clémentine Sarkozy. 2016. "Diffuse Large B-Cell Lymphoma: R-CHOP Failure-What to Do?" *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2016 (1): 366–78. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.366>.
- Colby, W. W., E. Y. Chen, D. H. Smith, and A. D. Levinson. 1983. "Identification and Nucleotide Sequence of a Human Locus Homologous to the V-Myc Oncogene of Avian Myelocytomatosis Virus MC29." *Nature* 301 (5902): 722–25. <https://doi.org/10.1038/301722a0>.
- Conacci-Sorrell, Maralice, Celine Ngouenet, Sarah Anderson, Thomas Brabletz, and Robert N. Eisenman. 2014. "Stress-Induced Cleavage of Myc Promotes Cancer Cell Survival." *Genes & Development* 28 (7): 689–707. <https://doi.org/10.1101/gad.231894.113>.



- Conacci-Sorrell, Maralice, Celine Ngouenet, and Robert N. Eisenman. 2010. "Myc-Nick: A Cytoplasmic Cleavage Product of Myc That Promotes Alpha-Tubulin Acetylation and Cell Differentiation." *Cell* 142 (3): 480–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.037>.
- Corso, Jasmin, Kuan-Ting Pan, Roland Walter, Carmen Doebele, Sebastian Mohr, Hanibal Bohnenberger, Philipp Ströbel, et al. 2016. "Elucidation of Tonic and Activated B-Cell Receptor Signaling in Burkitt's Lymphoma Provides Insights into Regulation of Cell Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (20): 5688–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601053113>.
- Cowling, V., and M. Cole. 2007. "An N-Myc Truncation Analogous to c-Myc-S Induces Cell Proliferation Independently of Transactivation but Dependent on Myc Homology Box II." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210734>.
- Cowling, Victoria H., Sanjay Chandriani, Michael L. Whitfield, and Michael D. Cole. 2006. "A Conserved Myc Protein Domain, MBIV, Regulates DNA Binding, Apoptosis, Transformation, and G2 Arrest." *Molecular and Cellular Biology* 26 (11): 4226–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.01959-05>.
- Cowling, Victoria H., and Michael D. Cole. 2007. "The Myc Transactivation Domain Promotes Global Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Independently of Direct DNA Binding." *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2059–73. <https://doi.org/10.1128/MCB.01828-06>.
- Cowling, Victoria H., and Michael D. Cole. 2010. "Myc Regulation of mRNA Cap Methylation." *Genes & Cancer* 1 (6): 576–79. <https://doi.org/10.1177/1947601910378025>.
- Créancier, L., P. Mercier, A. C. Prats, and D. Morello. 2001. "C-Myc Internal Ribosome Entry Site Activity Is Developmentally Controlled and Subjected to a Strong Translational Repression in Adult Transgenic Mice." *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1833–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1833-1840.2001>.
- Créancier, Laurent, Pascale Mercier, Anne-Catherine Prats, and Dominique Morello. 2001. "C-Myc Internal Ribosome Entry Site Activity Is Developmentally Controlled and Subjected to a Strong Translational Repression in Adult Transgenic Mice." *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1833–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1833-1840.2001>.
- Crombie, Jennifer, and Ann LaCasce. 2021. "The Treatment of Burkitt Lymphoma in Adults." *Blood* 137 (6): 743–50. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004099>.
- Cropley, Jennifer E., Catherine M. Suter, Kenneth B. Beckman, and David I. K. Martin. 2010. "CpG Methylation of a Silent Controlling Element in the Murine Avy Allele Is Incomplete and Unresponsive to Methyl Donor Supplementation." *PloS One* 5 (2): e9055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009055>.
- Crossen, P. E., and M. J. Morrison. 1999. "Methylation Status of the 3rd Exon of the C-MYC Oncogene in B-Cell Malignancies." *Leukemia Research* 23 (3): 251–53. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(98\)00167-2](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(98)00167-2).
- Csibi, Alfredo, Gina Lee, Sang-Oh Yoon, Haoxuan Tong, Didem Ilter, Ilaria Elia, Sarah-Maria Fendt, Thomas M. Roberts, and John Blenis. 2014. "The MTORC1/S6K1 Pathway Regulates Glutamine Metabolism through the EIF4B-Dependent Control of c-Myc Translation." *Current Biology: CB* 24 (19): 2274–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.007>.
- Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, and C. M. Croce. 1982. "Human C-Myc Onc Gene Is Located on the Region of Chromosome 8 That Is Translocated in Burkitt Lymphoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (24): 7824–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824>.
- Dang, C. V. 2007. "The Interplay between MYC and HIF in the Warburg Effect." *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, no. 4: 35–53. https://doi.org/10.1007/2789_2008_088.
- Dang, C. V., and W. M. Lee. 1988. "Identification of the Human C-Myc Protein Nuclear Translocation Signal." *Molecular and Cellular Biology* 8 (10): 4048–54. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.10.4048>.



- Dang, Chi V., Linda M. S. Resar, Eileen Emison, Sunkyu Kim, Qing Li, Julia E. Prescott, Diane Woney, and Karen Zeller. 1999. "Function of the C-Myc Oncogenic Transcription Factor." *Experimental Cell Research* 253 (1): 63–77. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4686>.
- David, Charles J., and James L. Manley. 2010. "Alternative Pre-mRNA Splicing Regulation in Cancer: Pathways and Programs Unhinged." *Genes & Development* 24 (21): 2343–64. <https://doi.org/10.1101/gad.1973010>.
- Davis, A. C., M. Wims, G. D. Spotts, S. R. Hann, and A. Bradley. 1993. "A Null C-Myc Mutation Causes Lethality before 10.5 Days of Gestation in Homozygotes and Reduced Fertility in Heterozygous Female Mice." *Genes & Development* 7 (4): 671–82. <https://doi.org/10.1101/gad.7.4.671>.
- De Silva, Nilushi S., and Ulf Klein. 2015. "Dynamics of B Cells in Germinal Centres." *Nature Reviews. Immunology* 15 (3): 137–48. <https://doi.org/10.1038/nri3804>.
- Della Rocca, Ana M., Letícia P. Leonart, Vinicius L. Ferreira, Fernanda S. Tonin, Giovanna Steffenello-Durigon, Joanita A. G. Del Moral, Fernando Fernandez-Llimos, and Roberto Pontarolo. 2021. "Chemotherapy Treatments for Burkitt Lymphoma: Systematic Review of Interventional Studies." *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 21 (8): 514–25. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.03.012>.
- Denis, N., A. Kitzis, J. Kruh, F. Dautry, and D. Corcos. 1991. "Stimulation of Methotrexate Resistance and Dihydrofolate Reductase Gene Amplification by C-Myc." *Oncogene* 6 (8): 1453–57.
- Derenzini, Enrico, Alessandra Rossi, and Davide Treré. 2018. "Treating Hematological Malignancies with Drugs Inhibiting Ribosome Biogenesis: When and Why." *Journal of Hematology & Oncology* 11 (May): 75. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0609-1>.
- DesJardins, E, and N Hay. 1993. "Repeated CT Elements Bound by Zinc Finger Proteins Control the Absolute and Relative Activities of the Two Principal Human C-Myc Promoters." *Molecular and Cellular Biology* 13 (9): 5710–24.
- Dhanasekaran, Renumathy, Anja Deutzmann, Wadie D. Mahauad-Fernandez, Aida S. Hansen, Arvin M. Gouw, and Dean W. Felsher. 2022. "The MYC Oncogene - the Grand Orchestrator of Cancer Growth and Immune Evasion." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 19 (1): 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2>.
- Dittharot, Kanthanadon, Sumana Dakeng, Parichat Suebsakwong, Apichart Suksamrarn, Pimpicha Patmasiriwat, and Moltira Promkan. 2019. "Cucurbitacin B Induces Hypermethylation of Oncogenes in Breast Cancer Cells." *Planta Medica* 85 (05): 370–78. <https://doi.org/10.1055/a-0791-1591>.
- Dolinoy, Dana C. 2008. "The Agouti Mouse Model: An Epigenetic Biosensor for Nutritional and Environmental Alterations on the Fetal Epigenome." *Nutrition Reviews* 66 Suppl 1 (August): S7-11. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00056.x>.
- Dorsett, Yair, Davide F. Robbiani, Mila Jankovic, Bernardo Reina-San-Martin, Thomas R. Eisenreich, and Michel C. Nussenzweig. 2007. "A Role for AID in Chromosome Translocations between C-Myc and the IgH Variable Region." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (9): 2225–32. <https://doi.org/10.1084/jem.20070884>.
- Doyle, G. A., N. A. Betz, P. F. Leeds, A. J. Fleisig, R. D. Prokipcak, and J. Ross. 1998. "The C-Myc Coding Region Determinant-Binding Protein: A Member of a Family of KH Domain RNA-Binding Proteins." *Nucleic Acids Research* 26 (22): 5036–44. <https://doi.org/10.1093/nar/26.22.5036>.
- Dujardin, Gwendal, Celina Lafaille, Ezequiel Petrillo, Valeria Buggiano, Luciana I. Gómez Acuña, Ana Fiszbein, Micaela A. Godoy Herz, et al. 2013. "Transcriptional Elongation and Alternative Splicing." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, RNA polymerase II Transcript Elongation, 1829 (1): 134–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.005>.
- Dunleavy, Kieron. 2018. "Approach to the Diagnosis and Treatment of Adult Burkitt's Lymphoma." *Journal of Oncology Practice* 14 (11): 665–71. <https://doi.org/10.1200/JOP.18.00148>.



- Dunn, Sianadh, and Victoria H. Cowling. 2015. "Myc and mRNA Capping." *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (5): 501–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.007>.
- Dunn, Sianadh, Olivia Lombardi, and Victoria H. Cowling. 2017. "C-Myc Co-Ordinates MRNA Cap Methylation and Ribosomal RNA Production." *Biochemical Journal* 474 (3): 377–84. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160930>.
- Eberhardy, S. R., and P. J. Farnham. 2001. "C-Myc Mediates Activation of the Cad Promoter via a Post-RNA Polymerase II Recruitment Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 48562–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109014200>.
- Efremov, Dimitar G., Sven Turkalj, and Luca Laurenti. 2020. "Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies." *Cancers* 12 (6): 1396. <https://doi.org/10.3390/cancers12061396>.
- Egle, Alexander, Alan W. Harris, Philippe Bouillet, and Suzanne Cory. 2004. "Bim Is a Suppressor of Myc-Induced Mouse B Cell Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16): 6164–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401471101>.
- Eischen, Christine M., David Woo, Martine F. Roussel, and John L. Cleveland. 2001. "Apoptosis Triggered by Myc-Induced Suppression of Bcl-XL or Bcl-2 Is Bypassed during Lymphomagenesis." *Molecular and Cellular Biology* 21 (15): 5063–70. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.5063-5070.2001>.
- Elbadawy, Mohamed, Tatsuya Usui, Hideyuki Yamawaki, and Kazuaki Sasaki. 2019. "Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9): 2340. <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>.
- Erikson, Jan, Abbas Ar-Rushdi, Helen L. Drwinga, Peter C. Nowell, and Carlo M. Croce. 1983. "Transcriptional Activation of the Translocated C-Myc Oncogene in Burkitt Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (3): 820–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.3.820>.
- Evan, G. I., and T. D. Littlewood. 1993. "The Role of C-Myc in Cell Growth." *Current Opinion in Genetics & Development* 3 (1): 44–49. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(05\)80339-9](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(05)80339-9).
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, C. S. Gilbert, T. D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C. M. Waters, L. Z. Penn, and D. C. Hancock. 1992. "Induction of Apoptosis in Fibroblasts by C-Myc Protein." *Cell* 69 (1): 119–28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90123-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90123-t).
- Evans, Joanne R., Sally A. Mitchell, Keith A. Spriggs, Jerzy Ostrowski, Karol Bomsztyk, Dirk Ostarek, and Anne E. Willis. 2003. "Members of the Poly (RC) Binding Protein Family Stimulate the Activity of the c-Myc Internal Ribosome Entry Segment in Vitro and in Vivo." *Oncogene* 22 (39): 8012–20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206645>.
- Eyss, Björn von, and Martin Eilers. 2011. "Addicted to Myc—but Why?" *Genes & Development* 25 (9): 895–97. <https://doi.org/10.1101/gad.2053311>.
- Facchini, L M, S Chen, W W Marhin, J N Lear, and L Z Penn. 1997. "The Myc Negative Autoregulation Mechanism Requires Myc-Max Association and Involves the c-Myc P2 Minimal Promoter." *Molecular and Cellular Biology* 17 (1): 100–114.
- Fagnocchi, Luca, Alessandro Cherubini, Hiroshi Hatsuda, Alessandra Fasciani, Stefania Mazzoleni, Vittoria Poli, Valeria Berno, et al. 2016. "A Myc-Driven Self-Reinforcing Regulatory Network Maintains Mouse Embryonic Stem Cell Identity." *Nature Communications* 7 (June). <https://doi.org/10.1038/ncomms11903>.
- Faiola, Francesco, Xiaohui Liu, Szuying Lo, Songqin Pan, Kangling Zhang, Elena Lyman, Anthony Farina, and Ernest Martinez. 2005. "Dual Regulation of C-Myc by P300 via Acetylation-Dependent Control of Myc Protein Turnover and Coactivation of Myc-Induced Transcription." *Molecular and Cellular Biology* 25 (23): 10220–34. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10220-10234.2005>.



- Fairlie, Walter Douglas, and Erinna F. Lee. 2021. "Co-Operativity between MYC and BCL-2 Pro-Survival Proteins in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (6): 2841. <https://doi.org/10.3390/ijms22062841>.
- Farrell, Amy S., and Rosalie C. Sears. 2014. "MYC Degradation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (3): a014365. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014365>.
- Fernandez-Sanchez, Maria Elena, Thomas Gonatopoulos-Pournatzis, Gavin Preston, Margaret A. Lawlor, and Victoria H. Cowling. 2009. "S-Adenosyl Homocysteine Hydrolase Is Required for Myc-Induced mRNA Cap Methylation, Protein Synthesis, and Cell Proliferation." *Molecular and Cellular Biology* 29 (23): 6182–91. <https://doi.org/10.1128/MCB.00973-09>.
- Ferrad, Melissa, Nour Ghazzoui, Hussein Issaoui, Jeanne Cook-Moreau, and Yves Denizot. 2020. "Mouse Models of C-Myc Deregulation Driven by IgH Locus Enhancers as Models of B-Cell Lymphomagenesis." *Frontiers in Immunology* 11: 1564. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01564>.
- Ferreira, Ana Carolina dos Santos, Julio Cesar Madureira de-Freitas-Junior, Jose Andres Morgado-Díaz, Anne J. Ridley, and Claudete Esteves Klumb. 2016. "Dual Inhibition of Histone Deacetylases and Phosphoinositide 3-Kinases: Effects on Burkitt Lymphoma Cell Growth and Migration." *Journal of Leukocyte Biology* 99 (4): 569–78. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A0415-162R>.
- Ferreira, Ana Carolina dos Santos, Marcela Cristina Robaina, Lídia Maria Magalhães de Rezende, Patricia Severino, and Claudete Esteves Klumb. 2014. "Histone Deacetylase Inhibitor Prevents Cell Growth in Burkitt's Lymphoma by Regulating PI3K/Akt Pathways and Leads to Upregulation of MiR-143, MiR-145, and MiR-101." *Annals of Hematology* 93 (6): 983–93. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2021-4>.
- Fiancette, Rémi, Rada Amin, Véronique Truffinet, Christelle Vincent-Fabert, Nadine Cogné, Michel Cogné, and Yves Denizot. 2010. "A Myeloma Translocation-like Model Associating CCND1 with the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus 3' Enhancers Does Not Promote by Itself B-Cell Malignancies." *Leukemia Research* 34 (8): 1043–51. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.11.017>.
- Filippova, G. N., S. Fagerlie, E. M. Klenova, C. Myers, Y. Dehner, G. Goodwin, P. E. Neiman, S. J. Collins, and V. V. Lobanenko. 1996. "An Exceptionally Conserved Transcriptional Repressor, CTCF, Employs Different Combinations of Zinc Fingers to Bind Diverged Promoter Sequences of Avian and Mammalian c-Myc Oncogenes." *Molecular and Cellular Biology* 16 (6): 2802–13. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.6.2802>.
- Finkin, Shlomo, Harald Hartweger, Thiago Y. Oliveira, Ervin E. Kara, and Michel C. Nussenzweig. 2019. "Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity." *Immunity* 51 (2): 324-336.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.013>.
- Gandarillas, Alberto, and Fiona M. Watt. 1997. "C-Myc Promotes Differentiation of Human Epidermal Stem Cells." *Genes & Development* 11 (21): 2869–82. <https://doi.org/10.1101/gad.11.21.2869>.
- Gao, Guozhen, Surbhi Dhar, and Mark T. Bedford. 2017. "PRMT5 Regulates IRES-Dependent Translation via Methylation of HnRNP A1." *Nucleic Acids Research* 45 (8): 4359–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1367>.
- Gao, Ping, Irina Tchernyshyov, Tsung-Cheng Chang, Yun-Sil Lee, Kayoko Kita, Takafumi Ochi, Karen I. Zeller, et al. 2009. "C-Myc Suppression of MiR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism." *Nature* 458 (7239): 762–65. <https://doi.org/10.1038/nature07823>.
- García-Gutiérrez, Lucía, Gabriel Bretones, Ester Molina, Ignacio Arechaga, Catherine Symonds, Juan C. Acosta, Rosa Blanco, et al. 2019. "Myc Stimulates Cell Cycle Progression through the Activation of Cdk1 and Phosphorylation of P27." *Scientific Reports* 9 (1): 18693. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54917-1>.



- García-Gutiérrez, Lucía, María Dolores Delgado, and Javier León. 2019. "MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes." *Genes* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/genes10030244>.
- Geltinger, C., K. Hörtnagel, and A. Polack. 1996. "TATA Box and Sp1 Sites Mediate the Activation of C-Myc Promoter P1 by Immunoglobulin Kappa Enhancers." *Gene Expression* 6 (2): 113–27.
- Gerbitz, A., J. Mautner, C. Geltinger, K. Hörtnagel, B. Christoph, H. Asenbauer, G. Klobeck, A. Polack, and G. W. Bornkamm. 1999. "Deregulation of the Proto-Oncogene c- Myc through t(8;22) Translocation in Burkitt's Lymphoma." *Oncogene* 18 (9): 1745–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202468>.
- Ghazzoui, Nour, Hussein Issaoui, Mélissa Ferrad, Claire Carrion, Jeanne Cook-Moreau, Yves Denizot, and François Boyer. 2020. "Eμ and 3'RR Transcriptional Enhancers of the IgH Locus Cooperate to Promote c-Myc-Induced Mature B-Cell Lymphomas." *Blood Advances* 4 (1): 28–39. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000845>.
- Ghazzoui, Nour, Alexis Saintamand, Hussein Issaoui, Christelle Vincent-Fabert, and Yves Denizot. 2017. "The IgH 3' Regulatory Region and c-Myc-Induced B-Cell Lymphomagenesis." *Oncotarget* 8 (4): 7059–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12535>.
- Gibbons, John G., Alan T. Branco, Susana A. Godinho, Shoukai Yu, and Bernardo Lemos. 2015. "Concerted Copy Number Variation Balances Ribosomal DNA Dosage in Human and Mouse Genomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (8): 2485–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416878112>.
- Gilbert, W. 1978. "Why Genes in Pieces?" *Nature* 271 (5645): 501. <https://doi.org/10.1038/271501a0>.
- Giulino-Roth, Lisa, Kai Wang, Theresa Y. MacDonald, Susan Mathew, Yifang Tam, Maureen T. Cronin, Gary Palmer, et al. 2012. "Targeted Genomic Sequencing of Pediatric Burkitt Lymphoma Identifies Recurrent Alterations in Antiapoptotic and Chromatin-Remodeling Genes." *Blood* 120 (26): 5181–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437624>.
- Godet, Anne-Claire, David Florian, Fransky Hantelys, Florence Tatin, Eric Lacazette, Barbara Garmy-Susini, and Anne-Catherine Prats. 2019. "IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (February): 924. <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>.
- Goetzman, Eric S., and Edward V. Prochownik. 2018. "The Role for Myc in Coordinating Glycolysis, Oxidative Phosphorylation, Glutaminolysis, and Fatty Acid Metabolism in Normal and Neoplastic Tissues." *Frontiers in Endocrinology* 9: 129. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00129>.
- Gombert, Wendy, Stephen Farris, Eric Rubio, Kristin Morey-Rosler, William Schubach, and Anton Krumm. 2004. "The C-Myc Insulator Element and Matrix Attachment Regions Define the c-Myc Chromosomal Domain." *Molecular and Cellular Biology* 23 (January): 9338–48. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9338-9348.2003>.
- Graham, Brittney S., and David T. Lynch. 2021. "Burkitt Lymphoma." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538148/>.
- Gravina, Giovanni L., Claudio Festuccia, Francesco Marampon, Vladimir M. Popov, Richard G. Pestell, Bianca M. Zani, and Vincenzo Tombolini. 2010. "Biological Rationale for the Use of DNA Methyltransferase Inhibitors as New Strategy for Modulation of Tumor Response to Chemotherapy and Radiation." *Molecular Cancer* 9 (1): 305. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-305>.
- Gregory, M. A., and S. R. Hann. 2000. "C-Myc Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: Stabilization of c-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells." *Molecular and Cellular Biology* 20 (7): 2423–35. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.7.2423-2435.2000>.
- Grummt, I. 2003. "Life on a Planet of Its Own: Regulation of RNA Polymerase I Transcription in the Nucleolus." *Genes & Development* 17 (14): 1691–1702. <https://doi.org/10.1101/gad.1098503R>.



- Grzes, Maria, Magdalena Oron, Zuzanna Staszczak, Akanksha Jaiswar, Magdalena Nowak-Niezgoda, and Dawid Walerych. 2020. "A Driver Never Works Alone—Interplay Networks of Mutant P53, MYC, RAS, and Other Universal Oncogenic Drivers in Human Cancer." *Cancers* 12 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061532>.
- Gu, Meigang, and Christopher D. Lima. 2005. "Processing the Message: Structural Insights into Capping and Decapping mRNA." *Current Opinion in Structural Biology* 15 (1): 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.009>.
- Halazonetis, Davis. 1993. "Both the Helix-Loop-Helix and the Leucine Zipper Motifs of c-Myc Contribute to Its Dimerization Specificity with Max." *Oncogene* 8 (1): 125–32.
- Hann, S. R., M. Dixit, R. C. Sears, and L. Sealy. 1994a. "Black." *Genes & Development* 8 (20): 2441–52. <https://doi.org/10.1101/gad.8.20.2441>.
- Hann, S. R., M. Dixit, R. C. Sears, and L. Sealy. 1994. "The Alternatively Initiated C-Myc Proteins Differentially Regulate Transcription through a Noncanonical DNA-Binding Site." *Genes & Development* 8 (20): 2441–52. <https://doi.org/10.1101/gad.8.20.2441>.
- Hann, S R, and R N Eisenman. 1984. "Proteins Encoded by the Human C-Myc Oncogene: Differential Expression in Neoplastic Cells." *Molecular and Cellular Biology* 4 (11): 2486–97.
- Hann, S. R., K. Sloan-Brown, and G. D. Spotts. 1992. "Translational Activation of the Non-AUG-Initiated c-Myc 1 Protein at High Cell Densities Due to Methionine Deprivation." *Genes & Development* 6 (7): 1229–40. <https://doi.org/10.1101/gad.6.7.1229>.
- Hann, Stephen R. 2006. "Role of Post-Translational Modifications in Regulating c-Myc Proteolysis, Transcriptional Activity and Biological Function." *Seminars in Cancer Biology* 16 (4): 288–302. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2006.08.004>.
- Hann, Stephen R., Michael W. King, David L. Bentley, Carl W. Anderson, and Robert N. Eisenman. 1988. "A Non-AUG Translational Initiation in c-Myc Exon 1 Generates an N-Terminally Distinct Protein Whose Synthesis Is Disrupted in Burkitt's Lymphomas." *Cell* 52 (2): 185–95. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90507-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90507-7).
- Harold, Cecelia M., Amber F. Buhagiar, Yan Cheng, and Susan J. Baserga. 2021. "Ribosomal RNA Transcription Regulation in Breast Cancer." *Genes* 12 (4): 502. <https://doi.org/10.3390/genes12040502>.
- Hatton, K. S., K. Mahon, L. Chin, F. C. Chiu, H. W. Lee, D. Peng, S. D. Morgenbesser, J. Horner, and R. A. DePinho. 1996. "Expression and Activity of L-Myc in Normal Mouse Development." *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1794–1804. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1794>.
- Hayden, Matthew S, and Sankar Ghosh. 2014. "Regulation of NF-KB by TNF Family Cytokines." *Seminars in Immunology* 26 (3): 253–66. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>.
- He, Stanley, Zhihui Liu, doo yi oh, and Carol Thiele. 2013. "MYCN and the Epigenome." *Frontiers in Oncology* 3 (January): 1. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00001>.
- Hecht, J. L., and J. C. Aster. 2000. "Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (21): 3707–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.21.3707>.
- Hemann, Hemann, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson Ja, Cordon-Cardo C, Cleveland JI, Tansey Wp, and Lowe Sw. 2005. "Evasion of the P53 Tumour Surveillance Network by Tumour-Derived MYC Mutants." *Nature* 436 (7052). <https://doi.org/10.1038/nature03845>.
- Henriksson, Marie, and Bernhard Lüscher. 1996. "Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation." *Advances in Cancer Research*, January. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60353-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60353-X).
- Herbst, Andreas, Michael T Hemann, Kathryn A Tworkowski, Simone E Salghetti, Scott W Lowe, and William P Tansey. 2005. "A Conserved Element in Myc That Negatively Regulates Its Proapoptotic Activity." *EMBO Reports* 6 (2): 177–83. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400333>.
- Hermeking, H., and D. Eick. 1994. "Mediation of C-Myc-Induced Apoptosis by P53." *Science (New York, N.Y.)* 265 (5181): 2091–93. <https://doi.org/10.1126/science.8091232>.



- Herrick, D. J., and J. Ross. 1994. "The Half-Life of c-Myc mRNA in Growing and Serum-Stimulated Cells: Influence of the Coding and 3' Untranslated Regions and Role of Ribosome Translocation." *Molecular and Cellular Biology* 14 (3): 2119–28. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.2119>.
- Hertz, Marla I., Dori M. Landry, Anne E. Willis, Guangxiang Luo, and Sunnie R. Thompson. 2013. "Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting." *Molecular and Cellular Biology* 33 (5): 1016–26. <https://doi.org/10.1128/MCB.00879-12>.
- Hnilicová, Jarmila, and David Staněk. 2011. "Where Splicing Joins Chromatin." *Nucleus* 2 (3): 182–88. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.3.15876>.
- Hoellein, Alexander, Mohammad Fallahi, Stephanie Schoeffmann, Sabine Steidle, Franz X. Schaub, Martina Rudelius, Iina Laitinen, et al. 2014. "Myc-Induced SUMOylation Is a Therapeutic Vulnerability for B-Cell Lymphoma." *Blood* 124 (13): 2081–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-584524>.
- Hoffman, B., and D. A. Liebermann. 2008. "Apoptotic Signaling by C-MYC." *Oncogene* 27 (50): 6462–72. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312>.
- Hostager, Bruce S., and Gail A. Bishop. 2013. "CD40-Mediated Activation of the NF- κ B Pathway." *Frontiers in Immunology* 4 (November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00376>.
- Hu, H.-M., K. Kanda, L. Zhang, and L. M. Boxer. 2007. "Activation of the C-Myc P1 Promoter in Burkitt's Lymphoma by the Hs3 Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Enhancer." *Leukemia* 21 (4): 747–53. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404583>.
- Hueber, A. O., M. Zörnig, D. Lyon, T. Suda, S. Nagata, and G. I. Evan. 1997. "Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5341): 1305–9. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1305>.
- Iaccarino, I., D. Hancock, G. Evan, and J. Downward. 2003. "C-Myc Induces Cytochrome c Release in Rat1 Fibroblasts by Increasing Outer Mitochondrial Membrane Permeability in a Bid-Dependent Manner." *Cell Death and Differentiation* 10 (5): 599–608. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401211>.
- Itkonen, Harri M., Sarah Minner, Ingrid J. Guldvik, Mareike Julia Sandmann, Maria Christina Tsourlakis, Viktor Berge, Aud Svindland, Thorsten Schlomm, and Ian G. Mills. 2013. "O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells." *Cancer Research* 73 (16): 5277–87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0549>.
- Izumi, H., C. Molander, L. Z. Penn, A. Ishisaki, K. Kohno, and K. Funa. 2001. "Mechanism for the Transcriptional Repression by C-Myc on PDGF Beta-Receptor." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 8): 1533–44.
- Jackson, Richard J., Christopher U. T. Hellen, and Tatyana V. Pestova. 2010. "The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (2): 113–27. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.
- Jackson, Richard J., Sarah L. Hunt, Catherine L. Gibbs, and Ann Kaminski. 1994. "Internal Initiation of Translation of Picornavirus RNAs." *Molecular Biology Reports* 19 (3): 147–59. <https://doi.org/10.1007/BF00986957>.
- Jensen, Niels A., Karen M. Pedersen, Frederikke Lihme, Lene Rask, Jakob V. Nielsen, Thomas E. Rasmussen, and Cathy Mitchelmore. 2003. "Astroglial C-Myc Overexpression Predisposes Mice to Primary Malignant Gliomas." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8300–8308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211195200>.
- Ji, Hongkai, George Wu, Xiangcan Zhan, Alexandra Nolan, Cheryl Koh, Angelo De Marzo, Hoang Mai Doan, et al. 2011. "Cell-Type Independent MYC Target Genes Reveal a Primordial Signature Involved in Biomass Accumulation." *PloS One* 6 (10): e26057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026057>.



- Jo, Oak D., Jheralyn Martin, Andrew Bernath, Janine Masri, Alan Lichtenstein, and Joseph Gera. 2008. "Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Regulates Cyclin D1 and C-Myc Internal Ribosome Entry Site Function through Akt Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 23274–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801185200>.
- Jong, Daphne de. 2009. "Novel Lymphoid Neoplasms – the Borderland between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Burkitt's Lymphoma." *Haematologica* 94 (7): 894–96. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.008128>.
- Joos, S., F. G. Haluska, M. H. Falk, B. Henglein, H. Hameister, C. M. Croce, and G. W. Bornkamm. 1992. "Mapping Chromosomal Breakpoints of Burkitt's t(8;14) Translocations Far Upstream of c-Myc." *Cancer Research* 52 (23): 6547–52.
- Jopling, Catherine L., Keith A. Spriggs, Sally A. Mitchell, Mark Stoneley, and Anne E. Willis. 2004. "L-Myc Protein Synthesis Is Initiated by Internal Ribosome Entry." *RNA (New York, N.Y.)* 10 (2): 287–98. <https://doi.org/10.1261/rna.5138804>.
- Jóźwiak, Paweł, Ewa Forma, Magdalena Bryś, and Anna Krześlak. 2014. "O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer." *Frontiers in Endocrinology* 5 (September): 145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00145>.
- Juin, Philippe, Anne-Odile Hueber, Trevor Littlewood, and Gerard Evan. 1999. "C-Myc-Induced Sensitization to Apoptosis Is Mediated through Cytochrome c Release." *Genes & Development* 13 (11): 1367–81.
- Junttila, Melissa R., and Jukka Westermarck. 2008. "Mechanisms of MYC Stabilization in Human Malignancies." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (5): 592–96. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5492>.
- Jurida, Liane, Johanna Soelch, Marek Bartkuhn, Katja Handschick, Helmut Müller, Doris Newel, Axel Weber, et al. 2015. "The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF-KB P65." *Cell Reports* 10 (5): 726–39. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.001>.
- Kalkat, Manpreet, Diana Resetca, Corey Lourenco, Pak-Kei Chan, Yong Wei, Yu-Jia Shiah, Natasha Vitkin, et al. 2018. "MYC Protein Interactome Profiling Reveals Functionally Distinct Regions That Cooperate to Drive Tumorigenesis." *Molecular Cell* 72 (5): 836-848.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.031>.
- Kamemura, Kazuo, Bradley K. Hayes, Frank I. Comer, and Gerald W. Hart. 2002. "Dynamic Interplay between O-Glycosylation and O-Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Alternative Glycosylation/Phosphorylation of THR-58, a Known Mutational Hot Spot of c-Myc in Lymphomas, Is Regulated by Mitogens." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 19229–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201729200>.
- Karube, Kenosuke, and Elias Campo. 2015. "MYC Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphomas." *Seminars in Hematology* 52 (2): 97–106. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.01.009>.
- Kasprzyk, Marta Elżbieta, Weronika Sura, and Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk. 2021. "Enhancing B-Cell Malignancies-On Repurposing Enhancer Activity towards Cancer." *Cancers* 13 (13): 3270. <https://doi.org/10.3390/cancers13133270>.
- Kato, G. J., J. Barrett, M. Villa-Garcia, and C. V. Dang. 1990. "An Amino-Terminal c-Myc Domain Required for Neoplastic Transformation Activates Transcription." *Molecular and Cellular Biology* 10 (11): 5914–20. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.11.5914-5920.1990>.
- Kazi, Aslamuzzaman, Shengyan Xiang, Hua Yang, Daniel Delitto, José Trevino, Rays H. Y. Jiang, Muhammad Ayaz, Harshani R. Lawrence, Perry Kennedy, and Saïd M. Sebti. 2018. "GSK3 Suppression Upregulates β -Catenin and c-Myc to Abrogate KRas-Dependent Tumors." *Nature Communications* 9 (December). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07644-6>.
- Kelemen, Katalin, Rita M. Brazier, Ken Gatter, Tony C. Bakke, Susan Olson, and Guang Fan. 2010. "Immunophenotypic Variations of Burkitt Lymphoma." *American Journal of Clinical Pathology* 134 (1): 127–38. <https://doi.org/10.1309/AJCP93LJPTRQPKR>.



- Kim, Hyeon Ho, Yuki Kuwano, Subramanya Srikantan, Eun Kyung Lee, Jennifer L. Martindale, and Myriam Gorospe. 2009. "HuR Recruits Let-7/RISC to Repress c-Myc Expression." *Genes & Development* 23 (15): 1743–48. <https://doi.org/10.1101/gad.1812509>.
- Kim, So, Andreas Herbst, Kathryn Tworkowski, Simone Salghetti, and William Tansey. 2003. "Skp2 Regulates Myc Protein Stability and Activity." *Molecular Cell* 11 (June): 1177–88. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00173-4).
- Klapproth, Kay, and Thomas Wirth. 2010. "Advances in the Understanding of MYC-Induced Lymphomagenesis." *British Journal of Haematology* 149 (4): 484–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08159.x>.
- Kohl, N. E., E. Legouy, R. A. DePinho, P. D. Nisen, R. K. Smith, C. E. Gee, and F. W. Alt. 1986. "Human N-Myc Is Closely Related in Organization and Nucleotide Sequence to c-Myc." *Nature* 319 (6048): 73–77. <https://doi.org/10.1038/319073a0>.
- Korać, Petra, Snježana Dotlić, Maja Matulić, Matea Zajc Petranović, and Mara Dominis. 2017. "Role of MYC in B Cell Lymphomagenesis." *Genes* 8 (4): E115. <https://doi.org/10.3390/genes8040115>.
- Koromilas, A. E., A. Lazaris-Karatzas, and N. Sonenberg. 1992. "MRNAs Containing Extensive Secondary Structure in Their 5' Non-Coding Region Translate Efficiently in Cells Overexpressing Initiation Factor EIF-4E." *The EMBO Journal* 11 (11): 4153–58.
- Kortlever, Roderik M., Nicole M. Sodik, Catherine H. Wilson, Deborah L. Burkhart, Luca Pellegrinet, Lamorna Brown Swigart, Trevor D. Littlewood, and Gerard I. Evan. 2017. "Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression." *Cell* 171 (6): 1301–1315.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.013>.
- Kovalchuk, Alexander L., Chen-Feng Qi, Ted A. Torrey, Lekidelu Taddesse-Heath, Lionel Feigenbaum, Sung Sup Park, Armin Gerbitz, et al. 2000. "Burkitt Lymphoma in the Mouse." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (8): 1183–90.
- Kress, Theresia R., Ian G. Cannell, Arjan B. Brenkman, Birgit Samans, Matthias Gaestel, Paul Roepman, Boudewijn M. Burgering, Martin Bushell, Andreas Rosenwald, and Martin Eilers. 2011. "The MK5/PRAK Kinase and Myc Form a Negative Feedback Loop That Is Disrupted during Colorectal Tumorigenesis." *Molecular Cell* 41 (4): 445–57. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.023>.
- Kretzmer, Helene, Stephan H. Bernhart, Wei Wang, Andrea Haake, Marc A. Weniger, Anke K. Bergmann, Matthew J. Betts, et al. 2015. "DNA-Methylome Analysis in Burkitt and Follicular Lymphomas Identifies Differentially Methylated Regions Linked to Somatic Mutation and Transcriptional Control." *Nature Genetics* 47 (11): 1316–25. <https://doi.org/10.1038/ng.3413>.
- Kretzmer, Helene, Stephan Bernhart, Wei Wang, Andrea Haake, Marc Weniger, Anke Bergmann, Matthew Betts, et al. 2015. "DNA Methylome Analysis in Burkitt and Follicular Lymphomas Identifies Differentially Methylated Regions Linked to Somatic Mutation and Transcriptional Control." *Nature Genetics* 47 (October). <https://doi.org/10.1038/ng.3413>.
- Kühn, Uwe, Miriam Gündel, Anne Knoth, Yvonne Kerwitz, Sabine Rüdell, and Elmar Wahle. 2009. "Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-Binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (34): 22803–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018226>.
- Küppers, R. 2005. "Mechanisms of B-Cell Lymphoma Pathogenesis." *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1589>.
- Kuschak, T. I., C. Taylor, E. McMillan-Ward, S. Israels, D. W. Henderson, J. F. Mushinski, J. A. Wright, and S. Mai. 1999. "The Ribonucleotide Reductase R2 Gene Is a Non-Transcribed Target of c-Myc-Induced Genomic Instability." *Gene* 238 (2): 351–65. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00341-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00341-8).
- Kuttler, F., and S. Mai. 2006. "C-Myc, Genomic Instability and Disease." *Genome Dynamics* 1: 171–90. <https://doi.org/10.1159/000092507>.



- Kuttler, Fabien, Patricia Amé, Helen Clark, Claudine Haughey, Christiane Mouglin, Jean-Yves Cahn, Chi V. Dang, Mark Raffeld, and Thierry Fest. 2001. "C-Myc Box II Mutations in Burkitt's Lymphoma-Derived Alleles Reduce Cell-Transformation Activity and Lower Response to Broad Apoptotic Stimuli." *Oncogene* 20 (42): 6084–94. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204827>.
- Kuzyk, Alexandra, and Sabine Mai. 2014. "C-MYC-Induced Genomic Instability." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014373>.
- Laird-Offringa, I A, P Elfferich, H J Knaken, J de Ruiter, and A J van der Eb. 1989. "Analysis of Polyadenylation Site Usage of the C-Myc Oncogene." *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6499–6514.
- Lang, Kenneth J. D., Andreas Kappel, and Gregory J. Goodall. 2002. "Hypoxia-Inducible Factor-1 α mRNA Contains an Internal Ribosome Entry Site That Allows Efficient Translation during Normoxia and Hypoxia." *Molecular Biology of the Cell* 13 (5): 1792–1801. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0017>.
- Langa, Francina, Isabelle Lafon, Sandrine Vandormael-Pournin, Michel Vidaud, Charles Babinet, and Dominique Morello. 2001. "Healthy Mice with an Altered C-Myc Gene: Role of the 3' Untranslated Region Revisited." *Oncogene* 20 (32): 4344–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204482>.
- Le Quesne, J. P., M. Stoneley, G. A. Fraser, and A. E. Willis. 2001. "Derivation of a Structural Model for the C-Myc IRES." *Journal of Molecular Biology* 310 (1): 111–26. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4745>.
- Lee, Da Hee, Na Eun Kwon, Won-Ji Lee, Moo-Seung Lee, Doo-Jin Kim, Ji Hyung Kim, and Sung-Kyun Park. 2020. "Increased O-GlcNAcylation of c-Myc Promotes Pre-B Cell Proliferation." *Cells* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/cells9010158>.
- Lee, Jue Er Amanda, Linda May Parsons, Leonie M. Quinn, Jue Er Amanda Lee, Linda May Parsons, and Leonie M. Quinn. 2014. "MYC Function and Regulation in Flies: How Drosophila Has Enlightened MYC Cancer Biology." *AIMS Genetics* 1 (1): 81–98. <https://doi.org/10.3934/genet.2014.1.81>.
- Lehr, Natalie von der, Sara Johansson, Siqin Wu, Fuad Bahram, Alina Castell, Cihan Cetinkaya, Per Hydbring, et al. 2003. "The F-Box Protein Skp2 Participates in c-Myc Proteasomal Degradation and Acts as a Cofactor for c-Myc-Regulated Transcription." *Molecular Cell* 11 (5): 1189–1200. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00193-X).
- Lenz, Georg, and Louis M. Staudt. 2010. "Aggressive Lymphomas." *The New England Journal of Medicine* 362 (15): 1417–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0807082>.
- Li, Feng, Yunyue Wang, Karen I. Zeller, James J. Potter, Diane R. Wonsey, Kathryn A. O'Donnell, Jung-whan Kim, Jason T. Yustein, Linda A. Lee, and Chi V. Dang. 2005. "Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 25 (14): 6225–34. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005>.
- Li, Shaoying, Ken H. Young, and L. Jeffrey Medeiros. 2018. "Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Pathology*, 50th anniversary review issue, 50 (1): 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.006>.
- Li, Yong, Michael W. Gordon, Zijun Y. Xu-Monette, Carlo Visco, Alexander Tzankov, Dehui Zou, Lugui Qiu, et al. 2013. "Single Nucleotide Variation in the TP53 3' Untranslated Region in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with Rituximab-CHOP: A Report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program." *Blood* 121 (22): 4529–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471722>.
- Liao, Baisong, Yan Hu, and Gary Brewer. 2007. "Competitive Binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA Controls Its Translation." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (6): 511–18. <https://doi.org/10.1038/nsmb1249>.
- Liao, D. J., and R. B. Dickson. 2000. "C-Myc in Breast Cancer." *Endocrine-Related Cancer* 7 (3): 143–64. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0070143>.



- Lin, Charles Y., Jakob Lovén, Peter B. Rahl, Ronald M. Paranal, Christopher B. Burge, James E. Bradner, Tong Ihn Lee, and Richard A. Young. 2012. "Transcriptional Amplification in Tumor Cells with Elevated C-Myc." *Cell* 151 (1): 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.026>.
- Lin, Y., K. Wong, and K. Calame. 1997. "Repression of C-Myc Transcription by Blimp-1, an Inducer of Terminal B Cell Differentiation." *Science (New York, N.Y.)* 276 (5312): 596–99. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.596>.
- Linch, David C. 2012. "Burkitt Lymphoma in Adults." *British Journal of Haematology* 156 (6): 693–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08877.x>.
- Liu, Meng-Ke, Xiao-Jian Sun, Xiao-Dong Gao, Ying Qian, Li Wang, and Wei-Li Zhao. 2021. "Methylation Alterations and Advance of Treatment in Lymphoma." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 26 (9): 602–13. <https://doi.org/10.52586/4970>.
- Livneh, Ido, Victoria Cohen-Kaplan, Chen Cohen-Rosenzweig, Noa Avni, and Aaron Ciechanover. 2016. "The Life Cycle of the 26S Proteasome: From Birth, through Regulation and Function, and onto Its Death." *Cell Research* 26 (8): 869–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.86>.
- Locke, Frederick L., Armin Ghobadi, Caron A. Jacobson, David B. Miklos, Lazaros J. Lekakis, Olalekan O. Oluwole, Yi Lin, et al. 2019. "Long-Term Safety and Activity of Axicabtagene Ciloleucel in Refractory Large B-Cell Lymphoma (ZUMA-1): A Single-Arm, Multicentre, Phase 1-2 Trial." *The Lancet. Oncology* 20 (1): 31–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7).
- López de Silanes, Isabel, María Paz Quesada, and Manel Esteller. 2007. "Aberrant Regulation of Messenger RNA 3'-Untranslated Region in Human Cancer." *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology* 29 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1155/2007/586139>.
- López, Cristina, Kortine Kleinheinz, Sietse M. Aukema, Marius Rohde, Stephan H. Bernhart, Daniel Hübschmann, Rabea Wagener, et al. 2019. "Genomic and Transcriptomic Changes Complement Each Other in the Pathogenesis of Sporadic Burkitt Lymphoma." *Nature Communications* 10 (1): 1459. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08578-3>.
- Lucas, J. M., N. M. Wilkie, and J. C. Lang. 1993. "C-MYC Repression of Promoter Activity through Core Promoter Elements." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194 (3): 1446–52. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1987>.
- Luo, Qi, Jun Li, Belgin Cenkci, and Leo Kretzner. 2004. "Autorepression of C-Myc Requires Both Initiator and E2F-Binding Site Elements and Cooperation with the P107 Gene Product." *Oncogene* 23 (5): 1088–97. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207225>.
- Lutterbach, B., and S. R. Hann. 1994. "Hierarchical Phosphorylation at N-Terminal Transformation-Sensitive Sites in c-Myc Protein Is Regulated by Mitogens and in Mitosis." *Molecular and Cellular Biology* 14 (8): 5510–22. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.8.5510-5522.1994>.
- Magrath, I. 1990. "The Pathogenesis of Burkitt's Lymphoma." *Advances in Cancer Research* 55: 133–270. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60470-4](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60470-4).
- Major, Ajay, and Sonali M. Smith. 2021. "DA-R-EPOCH vs R-CHOP in DLBCL: How Do We Choose?" *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 19 (11): 698–709.
- Malynn, Barbara A., Ignacio Moreno de Alboran, Rónán C. O'Hagan, Roderick Bronson, Laurie Davidson, Ronald A. DePinho, and Frederick W. Alt. 2000. "N-Myc Can Functionally Replace c-Myc in Murine Development, Cellular Growth, and Differentiation." *Genes & Development* 14 (11): 1390–99.
- Mansour, Mohammed A., Toshinori Hyodo, Khondker Ayesha Akter, Toshio Kokuryo, Keisuke Uehara, Masato Nagino, and Takeshi Senga. 2016. "SATB1 and SATB2 Play Opposing Roles in C-Myc Expression and Progression of Colorectal Cancer." *Oncotarget* 7 (4): 4993–5006. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6651>.
- Marampon, Francesco, Carmela Ciccarelli, and Bianca Maria Zani. 2019. "Biological Rationale for Targeting MEK/ERK Pathways in Anti-Cancer Therapy and to Potentiate Tumour Responses to Radiation." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102530>.



- Martisova, Andrea, Jitka Holcakova, Nasim Izadi, Ravery Sebuyoya, Roman Hrstka, and Martin Bartosik. 2021. "DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8): 4247. <https://doi.org/10.3390/ijms22084247>.
- Mata, Manuel de la, Claudio R. Alonso, Sebastián Kadener, Juan P. Fededa, Matías Blaustein, Federico Pelisch, Paula Cramer, David Bentley, and Alberto R. Kornblihtt. 2003. "A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing in Vivo." *Molecular Cell* 12 (2): 525–32. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>.
- Mateyak, M. K., A. J. Obaya, S. Adachi, and J. M. Sedivy. 1997. "Phenotypes of C-Myc-Deficient Rat Fibroblasts Isolated by Targeted Homologous Recombination." *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (10): 1039–48.
- McCracken, Susan, Nova Fong, Krassimir Yankulov, Scott Ballantyne, Guohua Pan, Jack Greenblatt, Scott D. Patterson, Marvin Wickens, and David L. Bentley. 1997. "The C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Couples MRNA Processing to Transcription." *Nature* 385 (6614): 357–61. <https://doi.org/10.1038/385357a0>.
- McMahon, Steven B. 2008. "Control of Nucleotide Biosynthesis by the MYC Oncoprotein." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (15): 2275–76.
- Millevoi, Stefania, and Stéphan Vagner. 2010. "Molecular Mechanisms of Eukaryotic Pre-mRNA 3' End Processing Regulation." *Nucleic Acids Research* 38 (9): 2757–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1176>.
- Mlynarczyk, Coraline, Lorena Fontán, and Ari Melnick. 2019. "Germinal Center-derived Lymphomas: The Darkest Side of Humoral Immunity." *Immunological Reviews* 288 (1): 214–39. <https://doi.org/10.1111/imr.12755>.
- Molyneux, Elizabeth M., Rosemary Rochford, Beverly Griffin, Robert Newton, Graham Jackson, Geetha Menon, Christine J. Harrison, Trijn Israels, and Simon Bailey. 2012. "Burkitt's Lymphoma." *The Lancet* 379 (9822): 1234–44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61177-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61177-X).
- Moore, Melissa J., and Nick J. Proudfoot. 2009. "Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation." *Cell* 136 (4): 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.001>.
- Morgan, H. D., H. G. Sutherland, D. I. Martin, and E. Whitelaw. 1999. "Epigenetic Inheritance at the Agouti Locus in the Mouse." *Nature Genetics* 23 (3): 314–18. <https://doi.org/10.1038/15490>.
- Moss, T., and V. Y. Stefanovsky. 1995. "Promotion and Regulation of Ribosomal Transcription in Eukaryotes by RNA Polymerase I." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 50: 25–66. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60810-7](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60810-7).
- Müller, J. R., S. Janz, J. J. Goedert, M. Potter, and C. S. Rabkin. 1995. "Persistence of Immunoglobulin Heavy Chain/c-Myc Recombination-Positive Lymphocyte Clones in the Blood of Human Immunodeficiency Virus-Infected Homosexual Men." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (14): 6577–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6577>.
- Murai, Noriyuki, Yasuko Murakami, Ayasa Tajima, and Senya Matsufuji. 2018. "Novel Ubiquitin-Independent Nucleolar c-Myc Degradation Pathway Mediated by Antizyme 2." *Scientific Reports* 8 (1): 3005. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21189-0>.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. "Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme." *Cell* 102 (5): 553–63. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7).
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N. O. Davidson, and T. Honjo. 1999. "Specific Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-Editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (26): 18470–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18470>.



- Mustachio, Lisa Maria, Jason Roszik, Aimee T Farria, Karla Guerra, and Sharon YR Dent. 2019. "Repression of GCN5 Expression or Activity Attenuates C-MYC Expression in Non-Small Cell Lung Cancer." *American Journal of Cancer Research* 9 (8): 1830–45.
- Nakamura, Naoya, Hirokazu Nakamine, Jun-Ichi Tamaru, Shigeo Nakamura, Tadashi Yoshino, Kouichi Ohshima, and Masafumi Abe. 2002. "The Distinction between Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma with c-Myc Rearrangement." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15 (7): 771–76. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000019577.73786.64>.
- Nanbru, Cécile, Anne-Catherine Prats, Louis Droogmans, Patrick Defrance, Georges Huez, and Véronique Kruys. 2001. "Translation of the Human C-Myc P0 Tricistronic mRNA Involves Two Independent Internal Ribosome Entry Sites." *Oncogene* 20 (31): 4270–80. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204548>.
- Nau, M. M., B. J. Brooks, J. Battey, E. Sausville, A. F. Gazdar, I. R. Kirsch, O. W. McBride, V. Bertness, G. F. Hollis, and J. D. Minna. 1985. "L-Myc, a New Myc-Related Gene Amplified and Expressed in Human Small Cell Lung Cancer." *Nature* 318 (6041): 69–73. <https://doi.org/10.1038/318069a0>.
- Neel, B G, S C Jhanwar, R S Chaganti, and W S Hayward. 1982. "Two Human C-Onc Genes Are Located on the Long Arm of Chromosome 8." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (24): 7842–46.
- Nelson, Brad H. 2010. "CD20+ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 185 (9): 4977–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001323>.
- Nguyen, Lynh, Peter Papenhausen, and Haipeng Shao. 2017. "The Role of C-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects." *Genes* 8 (4): E116. <https://doi.org/10.3390/genes8040116>.
- Nguyen, Tra-Ly, and Raúl V. Durán. 2018. "Glutamine Metabolism in Cancer Therapy." *Cancer Drug Resistance* 1 (3): 126–38. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.08>.
- Nie, Zuqin, Gangqing Hu, Gang Wei, Kairong Cui, Arito Yamane, Wolfgang Resch, Ruoning Wang, et al. 2012. "C-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells." *Cell* 151 (1): 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.033>.
- Nieminen, Anni I., Vilja M. Eskelinen, Heidi M. Haikala, Topi A. Tervonen, Yan Yan, Johanna I. Partanen, and Juha Klefström. 2013. "Myc-Induced AMPK-Phospho P53 Pathway Activates Bak to Sensitize Mitochondrial Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (20): E1839–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208530110>.
- Nieminen, Anni I, Johanna I Partanen, Annika Hau, and Juha Klefstrom. 2007. "C-Myc Primed Mitochondria Determine Cellular Sensitivity to TRAIL-Induced Apoptosis." *The EMBO Journal* 26 (4): 1055–67. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601551>.
- Nilsen, Timothy W., and Brenton R. Graveley. 2010. "Expansion of the Eukaryotic Proteome by Alternative Splicing." *Nature* 463 (7280): 457–63. <https://doi.org/10.1038/nature08909>.
- Nisen, Perry D., Kathryn A. Zimmerman, Sean V. Cotter, Fred Gilbert, and Frederick W. Alt. 1986. "Enhanced Expression of the N-Myc Gene in Wilms' Tumors." *Cancer Research* 46 (12 Part 1): 6217–22.
- Noguchi, K., C. Kitanaka, H. Yamana, A. Kokubu, T. Mochizuki, and Y. Kuchino. 1999. "Regulation of C-Myc through Phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-Terminal Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (46): 32580–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32580>.
- Nogués, Guadalupe, Sebastián Kadener, Paula Cramer, David Bentley, and Alberto R. Kornblihtt. 2002. "Transcriptional Activators Differ in Their Abilities to Control Alternative Splicing *." *Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 43110–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208418200>.
- Notari, Mario, Paolo Neviani, Ramasamy Santhanam, Bradley W. Blaser, Ji-Suk Chang, Annamaria Galiotta, Anne E. Willis, et al. 2006. "A MAPK/HNRPK Pathway Controls BCR/ABL Oncogenic



- Potential by Regulating MYC mRNA Translation." *Blood* 107 (6): 2507–16.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3732>.
- Noubissi, Felicite K., Mikhail A. Nikiforov, Nancy Colburn, and Vladimir S. Spiegelman. 2010. "Transcriptional Regulation of CRD-BP by c-Myc." *Genes & Cancer* 1 (10): 1074–82.
<https://doi.org/10.1177/1947601910395581>.
- Nowakowski, Grzegorz S., and Myron S. Czuczman. 2015. "ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection?" *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, e449-457. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e449.
- Obaya, Alvaro J., Maria K. Mateyak, and John M. Sedivy. 1999. "Mysterious Liaisons: The Relationship between c-Myc and the Cell Cycle." *Oncogene* 18 (19): 2934–41.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202749>.
- O'Donnell, Kathryn A., Erik A. Wentzel, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, and Joshua T. Mendell. 2005. "C-Myc-Regulated MicroRNAs Modulate E2F1 Expression." *Nature* 435 (7043): 839–43.
<https://doi.org/10.1038/nature03677>.
- Ohtsuki, T., K. Nishitani, A. Hatamochi, Y. Yawata, and M. Namba. 1991. "Analysis of Methylation in the C-MYC Gene in Five Human Myeloma Cell Lines." *British Journal of Haematology* 77 (2): 172–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb07973.x>.
- Otsuka, Hiroshi, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Kent E. Duncan, and Toshinobu Fujiwara. 2019. "Emerging Evidence of Translational Control by AU-Rich Element-Binding Proteins." *Frontiers in Genetics* 10: 332. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00332>.
- Ott, German, Andreas Rosenwald, and Elias Campo. 2013. "Understanding MYC-Driven Aggressive B-Cell Lymphomas: Pathogenesis and Classification." *Blood* 122 (24): 3884–91.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-498329>.
- Packham, G., and J. L. Cleveland. 1994. "Ornithine Decarboxylase Is a Mediator of C-Myc-Induced Apoptosis." *Molecular and Cellular Biology* 14 (9): 5741–47.
<https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.5741-5747.1994>.
- Park, Sung Sup, Joong Su Kim, Lino Tessarollo, James D. Owens, Liangping Peng, Seong Su Han, Seung Tae Chung, et al. 2005. "Insertion of C-Myc into Igh Induces B-Cell and Plasma-Cell Neoplasms in Mice." *Cancer Research* 65 (4): 1306–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0268>.
- Park, Sung Sup, Arthur L. Shaffer, Joong Su Kim, Wendy duBois, Michael Potter, Louis M. Staudt, and Siegfried Janz. 2005. "Insertion of Myc into Igh Accelerates Peritoneal Plasmacytomas in Mice." *Cancer Research* 65 (17): 7644–52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1222>.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Küppers, and R. Dalla-Favera. 2001. "Hypermutation of Multiple Proto-Oncogenes in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphomas." *Nature* 412 (6844): 341–46. <https://doi.org/10.1038/35085588>.
- Pasqualucci, Laura, and Riccardo Dalla-Favera. 2018. "Genetics of Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Blood* 131 (21): 2307–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-764332>.
- Patel, Ayushi S., Seungyeul Yoo, Ranran Kong, Takashi Sato, Abhilasha Sinha, Li Bao, Maya Fridrikh, et al. 2020. "Classic Oncogene Family Myc Defines Unappreciated Distinct Lineage States of Small Cell Lung Cancer." *BioRxiv*, April, 852939. <https://doi.org/10.1101/852939>.
- Patel, Jagruti H., Yanping Du, Penny G. Ard, Charles Phillips, Beth Carella, Chi-Ju Chen, Carrie Rakowski, et al. 2004. "The C-MYC Oncoprotein Is a Substrate of the Acetyltransferases HGCN5/PCAF and TIP60." *Molecular and Cellular Biology* 24 (24): 10826–34.
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10826-10834.2004>.
- Pedraza, Ricardo Martínez, Lady Paola Aristizabal Arboleda, Celeste Sánchez-Romero, Jesús Alfonso Aguirre Quiñones, Carlos de Jesús Mata Tovar, Javier Rendón Henao, and Oslei Paes de Almeida. 2019. "Intraoral EBV-Positive Sporadic Burkitt Lymphoma in an Elderly Patient with Bilateral Presentation." *Autopsy & Case Reports* 9 (4): e2019117.
<https://doi.org/10.4322/acr.2019.117>.



- Pelicci, P G, D M Knowles, I Magrath, and R Dalla-Favera. 1986. "Chromosomal Breakpoints and Structural Alterations of the C-Myc Locus Differ in Endemic and Sporadic Forms of Burkitt Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (9): 2984–88.
- Penn, L. J., M. W. Brooks, E. M. Laufer, and H. Land. 1990. "Negative Autoregulation of C-Myc Transcription." *The EMBO Journal* 9 (4): 1113–21.
- Pheesse, T J, K B Myant, A M Cole, R A Ridgway, H Pearson, V Muncan, G R van den Brink, et al. 2014. "Endogenous C-Myc Is Essential for P53-Induced Apoptosis in Response to DNA Damage in Vivo." *Cell Death and Differentiation* 21 (6): 956–66. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.15>.
- Poortinga, Gretchen, Meaghan Wall, Elaine Sanij, Kasia Siwicki, Jason Ellul, Daniel Brown, Timothy P. Holloway, Ross D. Hannan, and Grant A. McArthur. 2011. "C-MYC Coordinately Regulates Ribosomal Gene Chromatin Remodeling and Pol I Availability during Granulocyte Differentiation." *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 39 (8). <https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/338269-c-myc-coordinately-regulates-ribosomal-gene-chromatin-remodeling-and-pol-i-availability-during-granulocyte-differentiation>.
- Popov, Nikita, Christina Schüle, Laura A. Jaenicke, and Martin Eilers. 2010. "Ubiquitylation of the Amino Terminus of Myc by SCF β -TrCP Antagonizes SCFFbw7-Mediated Turnover." *Nature Cell Biology* 12 (10): 973–81. <https://doi.org/10.1038/ncb2104>.
- Qi, Chen-Feng, Annica Martensson, Michela Mattioli, Riccardo Dalla-Favera, Victor V. Lobanenko, and Herbert C. Morse. 2003. "CTCF Functions as a Critical Regulator of Cell-Cycle Arrest and Death after Ligation of the B Cell Receptor on Immature B Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2): 633–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237127100>.
- Quelle, D. E., F. Zindy, R. A. Ashmun, and C. J. Sherr. 1995. "Alternative Reading Frames of the INK4a Tumor Suppressor Gene Encode Two Unrelated Proteins Capable of Inducing Cell Cycle Arrest." *Cell* 83 (6): 993–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90214-7).
- Rabbitts, P H, J V Watson, A Lamond, A Forster, M A Stinson, G Evan, W Fischer, E Atherton, R Sheppard, and T H Rabbitts. 1985. "Metabolism of C-Myc Gene Products: C-Myc mRNA and Protein Expression in the Cell Cycle." *The EMBO Journal* 4 (8): 2009–15.
- Ramanathan, Anand, G. Brett Robb, and Siu-Hong Chan. 2016. "MRNA Capping: Biological Functions and Applications." *Nucleic Acids Research* 44 (16): 7511–26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>.
- Ramsay, G., G. I. Evan, and J. M. Bishop. 1984. "The Protein Encoded by the Human Proto-Oncogene c-Myc." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (24): 7742–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7742>.
- Ravid, Tommer, and Mark Hochstrasser. 2008. "Diversity of Degradation Signals in the Ubiquitin-Proteasome System." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (9): 679–90. <https://doi.org/10.1038/nrm2468>.
- Ray, D., and J. Robert-Lézénès. 1989. "Coexistence of a C-Myc mRNA Initiated in Intron 1 with the Normal c-Myc mRNA and Similar Regulation of Both Transcripts in Mammalian Cells." *Oncogene Research* 5 (1): 73–78.
- Ray, Thomas A., Kelly Cochran, Chris Kozlowski, Jingjing Wang, Graham Alexander, Martha A. Cady, William J. Spencer, et al. 2020. "Comprehensive Identification of MRNA Isoforms Reveals the Diversity of Neural Cell-Surface Molecules with Roles in Retinal Development and Disease." *Nature Communications* 11 (1): 3328. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17009-7>.
- Reed, J C, J D Alpers, and P C Nowell. 1987. "Expression of C-Myc Proto-Oncogene in Normal Human Lymphocytes. Regulation by Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms." *Journal of Clinical Investigation* 80 (1): 101–6. <https://doi.org/10.1172/JCI113034>.
- Ribrag, Vincent, Serge Koscielny, Jacques Bosq, Thibaut Leguay, Olivier Casasnovas, Luc-Mathieu Fornecker, Christian Recher, et al. 2016. "Rituximab and Dose-Dense Chemotherapy for Adults with Burkitt's Lymphoma: A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial."



- Lancet (London, England)* 387 (10036): 2402–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01317-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01317-3).
- Ricci, M. Stacey, Zhaoyu Jin, Michael Dews, Duonan Yu, Andrei Thomas-Tikhonenko, David T. Dicker, and Wafik S. El-Deiry. 2004. "Direct Repression of FLIP Expression by C-Myc Is a Major Determinant of TRAIL Sensitivity." *Molecular and Cellular Biology* 24 (19): 8541–55. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8541-8555.2004>.
- Riedell, Peter, and Sonali Smith. 2018. "Double Hit and Double Expressors in Lymphoma: Definition and Treatment." *Cancer* 124 (September). <https://doi.org/10.1002/cncr.31646>.
- Robert-Lezenes, Ray, Meneceur P, Tavitian A, and Robert-Lezenes J. 1987. "Presence of a C-Myc Transcript Initiated in Intron 1 in Friend Erythroleukemia Cells and in Other Murine Cell Types with No Evidence of c-Myc Gene Rearrangement." *Molecular and Cellular Biology* 7 (2): 940–45. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.940>.
- Ro-Choi, Tae Suk, and Yong Chun Choi. 2019. "The Analysis of Structure of C-Myc Gene Transcript," 7.
- Rockwood, Lynne D., Ted A. Torrey, Joong Su Kim, Allen E. Coleman, Alexander L. Kovalchuk, Shao Xiang, Thomas Ried, Herbert C. Morse, and Siegfried Janz. 2002. "Genomic Instability in Mouse Burkitt Lymphoma Is Dominated by Illegitimate Genetic Recombinations, Not Point Mutations." *Oncogene* 21 (47): 7235–40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205697>.
- Roschke, Viktor, Eugene Kopantzev, Mark Dertzbaugh, and Stuart Rudikoff. 1997. "Chromosomal Translocations Deregulating C- Myc Are Associated with Normal Immune Responses." *Oncogene* 14 (25): 3011–16. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201156>.
- Rosean, T. R., C. J. Holman, V. S. Tompkins, X. Jing, M. D. Krasowski, S. Rose-John, and S. Janz. 2016. "KSHV-Encoded VIL-6 Collaborates with Deregulated c-Myc to Drive Plasmablastic Neoplasms in Mice." *Blood Cancer Journal* 6 (February): e398. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.6>.
- Rosenwald, Andreas, Laurie H Sehn, and Delphine Maucourt-Boulch. 2018. "Prognostic Significance of MYC Single, Double, Triple Hit and MYC-Translocation Partner Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma - a Study By the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC)." *Blood* 132 (Supplement 1): 344–344. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113368>.
- Rouaud, Pauline, Rémi Fiancette, Christelle Vincent-Fabert, Virginie Magnone, Michel Cogné, Pierre Dubus, and Yves Denizot. 2012. "Mantle Cell Lymphoma-like Lymphomas in c-Myc-3'RR/P53+/- Mice and c-Myc-3'RR/Cdk4R24C Mice: Differential Oncogenic Mechanisms but Similar Cellular Origin." *Oncotarget* 3 (5): 586–93. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.474>.
- Ruiz-Pérez, María Victoria, Aine Brigette Henley, and Marie Arsenian-Henriksson. 2017. "The MYCN Protein in Health and Disease." *Genes* 8 (4): 113. <https://doi.org/10.3390/genes8040113>.
- Sabò, Arianna, Theresia R. Kress, Mattia Pelizzola, Stefano de Pretis, Marcin M. Gorski, Alessandra Tesi, Marco J. Morelli, et al. 2014. "Selective Transcriptional Regulation by Myc in Cellular Growth Control and Lymphomagenesis." *Nature* 511 (7510): 488–92. <https://doi.org/10.1038/nature13537>.
- Sakamuro, Daitoku, and George C. Prendergast. 1999. "New Myc-Interacting Proteins: A Second Myc Network Emerges." *Oncogene* 18 (19): 2942–54. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202725>.
- Saleh, Khalil, Jean-Marie Michot, Valérie Camara-Clayette, Yegor Vassetsky, and Vincent Ribrag. 2020. "Burkitt and Burkitt-Like Lymphomas: A Systematic Review." *Current Oncology Reports* 22 (4): 33. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0898-8>.
- Salghetti, S. E., S. Y. Kim, and W. P. Tansey. 1999. "Destruction of Myc by Ubiquitin-Mediated Proteolysis: Cancer-Associated and Transforming Mutations Stabilize Myc." *The EMBO Journal* 18 (3): 717–26. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.717>.
- Sanchez-Martin, Marta, and Adolfo Ferrando. 2017. "The NOTCH1-MYC Highway toward T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood* 129 (9): 1124–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-692582>.
- Sanij, Elaine, Gretchen Poortinga, Kerith Sharkey, Sandy Hung, Timothy P. Holloway, Jaclyn Quin, Elysia Robb, et al. 2008. "UBF Levels Determine the Number of Active Ribosomal RNA Genes in Mammals." *The Journal of Cell Biology* 183 (7): 1259–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805146>.



- Saphire, A. C., S. J. Bark, and L. Gerace. 1998. "All Four Homochiral Enantiomers of a Nuclear Localization Sequence Derived from C-Myc Serve as Functional Import Signals." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29764–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29764>.
- Scafuro, Marika, Lucia Capasso, Vincenzo Carafa, Lucia Altucci, and Angela Nebbioso. 2021. "Gene Transactivation and Transrepression in MYC-Driven Cancers." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3458. <https://doi.org/10.3390/ijms22073458>.
- Scheller, H., S. Tobollik, A. Kutzera, M. Eder, J. Unterlehberg, I. Pfeil, and B. Jungnickel. 2010. "C-Myc Overexpression Promotes a Germinal Center-like Program in Burkitt's Lymphoma." *Oncogene* 29 (6): 888–97. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.377>.
- Schnekenburger, Michael, and Marc Diederich. 2015. "Nutritional Epigenetic Regulators in the Field of Cancer: New Avenues for Chemopreventive Approaches." *Epigenetic Cancer Therapy*, December, 393–425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00018-5>.
- Sears, R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai, and J. R. Nevins. 2000. "Multiple Ras-Dependent Phosphorylation Pathways Regulate Myc Protein Stability." *Genes & Development* 14 (19): 2501–14. <https://doi.org/10.1101/gad.836800>.
- Sears, Rosalie C. 2004. "The Life Cycle of C-Myc: From Synthesis to Degradation." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (9): 1133–37.
- Sharrard, R. M., J. A. Royds, S. Rogers, and A. J. Shorthouse. 1992. "Patterns of Methylation of the C-Myc Gene in Human Colorectal Cancer Progression." *British Journal of Cancer* 65 (5): 667–72. <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.142>.
- Shi, Y., Y. Yang, B. Hoang, C. Bardeleben, B. Holmes, J. Gera, and A. Lichtenstein. 2016. "Therapeutic Potential of Targeting IRES-Dependent c-Myc Translation in Multiple Myeloma Cells during ER Stress." *Oncogene* 35 (8): 1015–24. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.156>.
- Shim, Hyunsuk, Yoon S. Chun, Brian C. Lewis, and Chi V. Dang. 1998. "A Unique Glucose-Dependent Apoptotic Pathway Induced by c-Myc." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (4): 1511–16.
- Silverstein, Adam M., Christina A. Barrow, Anthony J. Davis, and Marc C. Mumby. 2002. "Actions of PP2A on the MAP Kinase Pathway and Apoptosis Are Mediated by Distinct Regulatory Subunits." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4221–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.072071699>.
- Singh, Kamini, Jianan Lin, Yi Zhong, Antonija Burčul, Prathibha Mohan, Man Jiang, Liping Sun, et al. 2019. "C-MYC Regulates mRNA Translation Efficiency and Start-Site Selection in Lymphoma." *The Journal of Experimental Medicine* 216 (7): 1509–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20181726>.
- Škunca, Željka. 2019. *B Cell Lymphomagenesis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87241>.
- Small, George W., Teh-Ying Chou, Chi V. Dang, and Robert Z. Orlowski. 2002. "Evidence for Involvement of Calpain in C-Myc Proteolysis in Vivo." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400 (2): 151–61. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00005-X).
- Smith, Keriayn N., Amar M. Singh, and Stephen Dalton. 2010. "Myc Represses Primitive Endoderm Differentiation in Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7 (3): 343–54. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.023>.
- Smith, Mitchell R. 2003. "Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms of Action and Resistance." *Oncogene* 22 (47): 7359–68. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206939>.
- Smith, R K, K Zimmerman, G D Yancopoulos, A Ma, and F W Alt. 1992. "Transcriptional Down-Regulation of N-Myc Expression during B-Cell Development." *Molecular and Cellular Biology* 12 (4): 1578–84.
- Soucie, Erinn L., Matthew G. Annis, John Sedivy, Jorge Filmus, Brian Leber, David W. Andrews, and Linda Z. Penn. 2001. "Myc Potentiates Apoptosis by Stimulating Bax Activity at the Mitochondria." *Molecular and Cellular Biology* 21 (14): 4725–36. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4725-4736.2001>.



- Spencer, C. A., R. C. LeStrange, U. Novak, W. S. Hayward, and M. Groudine. 1990. "The Block to Transcription Elongation Is Promoter Dependent in Normal and Burkitt's Lymphoma c-Myc Alleles." *Genes & Development* 4 (1): 75–88. <https://doi.org/10.1101/gad.4.1.75>.
- Spencer, Charlotte A., and Mark Groudine. 1991. "Control of C-Myc Regulation in Normal and Neoplastic Cells." In *Advances in Cancer Research*, 56:1–48. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60476-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60476-5).
- Spotts, G. D., S. V. Patel, Q. Xiao, and S. R. Hann. 1997. "Identification of Downstream-Initiated c-Myc Proteins Which Are Dominant-Negative Inhibitors of Transactivation by Full-Length c-Myc Proteins." *Molecular and Cellular Biology* 17 (3): 1459–68. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1459>.
- Spriggs, K. A., M. Bushell, S. A. Mitchell, and A. E. Willis. 2005. "Internal Ribosome Entry Segment-Mediated Translation during Apoptosis: The Role of IRES-Trans-Acting Factors." *Cell Death and Differentiation* 12 (6): 585–91. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401642>.
- Stanton, Brian R., Archibald S. Perkins, Lino Tessarollo, David A. Sassoon, and Luis F. Parada. 1992. "Loss of N-Myc Function Results in Embryonic Lethality and Failure of the Epithelial Component of the Embryo to Develop." *Genes and Development* 6 (12): 2235–47. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12a.2235>.
- Stoneley, Mark, Stephen A. Chappell, Catherine L. Jopling, Martin Dickens, Marion MacFarlane, and Anne E. Willis. 2000. "C-Myc Protein Synthesis Is Initiated from the Internal Ribosome Entry Segment during Apoptosis." *Molecular and Cellular Biology* 20 (4): 1162–69.
- Stoneley, Mark, Fiona Paulin, John Le Quesne, Stephen Chappell, and Anne Willis. 1998. "C-Myc 5' Untranslated Region Contains an Internal Ribosome Entry Segment." *Oncogene* 16 (February): 423–28. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201763>.
- Stoneley, Mark, Tatyana Subkhankulova, John P. C. Le Quesne, Mark J. Coldwell, Catherine L. Jopling, Graham J. Belsham, and Anne E. Willis. 2000. "Analysis of the C-Myc IRES; a Potential Role for Cell-Type Specific Trans-Acting Factors and the Nuclear Compartment." *Nucleic Acids Research* 28 (3): 687–94.
- Stoneley, Mark, and Anne E. Willis. 2004. "Cellular Internal Ribosome Entry Segments: Structures, Trans-Acting Factors and Regulation of Gene Expression." *Oncogene* 23 (18): 3200–3207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207551>.
- Strobl, L. J., and D. Eick. 1992. "Hold Back of RNA Polymerase II at the Transcription Start Site Mediates Down-Regulation of c-Myc in Vivo." *The EMBO Journal* 11 (9): 3307–14.
- Strobl, L. J., F. Kohlhuber, J. Mautner, A. Polack, and D. Eick. 1993. "Absence of a Paused Transcription Complex from the C-Myc P2 Promoter of the Translocation Chromosome in Burkitt's Lymphoma Cells: Implication for the c-Myc P1/P2 Promoter Shift." *Oncogene* 8 (6): 1437–47.
- Subkhankulova, T., S. A. Mitchell, and A. E. Willis. 2001. "Internal Ribosome Entry Segment-Mediated Initiation of c-Myc Protein Synthesis Following Genotoxic Stress." *The Biochemical Journal* 359 (Pt 1): 183–92. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590183>.
- Sun, Xiao-Xin, Yingxiao Chen, Yulong Su, Xiaoyan Wang, Krishna Mohan Chauhan, Juan Liang, Colin J. Daniel, Rosalie C. Sears, and Mu-Shui Dai. 2018. "SUMO Protease SENP1 DeSUMOylates and Stabilizes C-Myc." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (43): 10983–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802932115>.
- Sun, Xiao-Xin, Yanping Li, Rosalie C. Sears, and Mu-Shui Dai. 2021. "Targeting the MYC Ubiquitination-Proteasome Degradation Pathway for Cancer Therapy." *Frontiers in Oncology* 11: 679445. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.679445>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.



- Swerdlow, Steven H., Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, et al. 2016. "The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms." *Blood* 127 (20): 2375–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tansey, William P. 2014. "Mammalian MYC Proteins and Cancer." Review Article. *New Journal of Science*. February 2, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/757534>.
- Taparra, Kekoa, Hailun Wang, Reem Malek, Audrey Lafargue, Mustafa A. Barbhuiya, Xing Wang, Brian W. Simons, et al. 2019. "O-GlcNAcylation Is Required for Mutant *KRAS*-Induced Lung Tumorigenesis." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (11): 4924–37. <https://doi.org/10.1172/JCI94844>.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson, and P. Leder. 1982. "Translocation of the C-Myc Gene into the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Human Burkitt Lymphoma and Murine Plasmacytoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (24): 7837–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7837>.
- Thoma, Christian, Giovanna Bergamini, Bruno Galy, Patrick Hundsdoerfer, and Matthias W. Hentze. 2004. "Enhancement of IRES-Mediated Translation of the c-Myc and BiP MRNAs by the Poly(A) Tail Is Independent of Intact EIF4G and PABP." *Molecular Cell* 15 (6): 925–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.021>.
- Thoma, Christian, Sven Fraterman, Marc Gentzel, Matthias Wilm, and Matthias W. Hentze. 2008. "Translation Initiation by the C-Myc mRNA Internal Ribosome Entry Sequence and the Poly(A) Tail." *RNA* 14 (8): 1579–89. <https://doi.org/10.1261/rna.1043908>.
- Thomas, Lance R., and William P. Tansey. 2011. "Proteolytic Control of the Oncoprotein Transcription Factor Myc." *Advances in Cancer Research* 110: 77–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386469-7.00004-9>.
- Truffinet, Véronique, Eric Pinaud, Nadine Cogné, Barbara Petit, Laurence Guglielmi, Michel Cogné, and Yves Denizot. 2007. "The 3' IgH Locus Control Region Is Sufficient to Deregulate a c-Myc Transgene and Promote Mature B Cell Malignancies with a Predominant Burkitt-like Phenotype." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (9): 6033–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6033>.
- Tsujiuchi, T., M. Tsutsumi, Y. Sasaki, M. Takahama, and Y. Konishi. 1999. "Hypomethylation of CpG Sites and C-Myc Gene Overexpression in Hepatocellular Carcinomas, but Not Hyperplastic Nodules, Induced by a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined Diet in Rats." *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 90 (9): 909–13. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00834.x>.
- Vafa, Omid, Mark Wade, Suzanne Kern, Michelle Beeche, Tej K. Pandita, Garret M. Hampton, and Geoffrey M. Wahl. 2002. "C-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate P53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability." *Molecular Cell* 9 (5): 1031–44. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00520-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00520-8).
- Vaklavas, Christos, Zheng Meng, Hyungsoo Choi, William E Grizzle, Kurt R Zinn, and Scott W Blume. 2015. "Small Molecule Inhibitors of IRES-Mediated Translation." *Cancer Biology & Therapy* 16 (10): 1471–85. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1071729>.
- Valente, L. J., S. Grabow, C. J. Vandenberg, A. Strasser, and A. Janic. 2016. "Combined Loss of PUMA and P21 Accelerates C-MYC-Driven Lymphoma Development Considerably Less than Loss of One Allele of P53." *Oncogene* 35 (29): 3866–71. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.457>.
- Valera, Alexandra, Armando López-Guillermo, Teresa Cardesa-Salzmann, Fina Climent, Eva González-Barca, Santiago Mercadal, Iñigo Espinosa, et al. 2013. "MYC Protein Expression and Genetic Alterations Have Prognostic Impact in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated



- with Immunochemotherapy." *Haematologica* 98 (10): 1554–62.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2013.086173>.
- Vallespinós, Mireia, David Fernández, Lorena Rodríguez, Josué Alvaro-Blanco, Esther Baena, Maitane Ortiz, Daniela Dukovska, et al. 2011. "B Lymphocyte Commitment Program Is Driven by the Proto-Oncogene c-Myc." *The Journal of Immunology* 186 (12): 6726–36.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002753>.
- Varlakhanova, Natalia V., Rebecca F. Cotterman, Wilhelmine N. deVries, Judy Morgan, Leah Rae Donahue, Stephen Murray, Barbara B. Knowles, and Paul S. Knoepfler. 2010. "Myc Maintains Embryonic Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal." *Differentiation* 80 (1): 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2010.05.001>.
- Vincent-Fabert, Christelle, Remi Fiancette, Eric Pinaud, Véronique Truffinet, Nadine Cogné, Michel Cogné, and Yves Denizot. 2010. "Genomic Deletion of the Whole IgH 3' Regulatory Region (Hs3a, Hs1,2, Hs3b, and Hs4) Dramatically Affects Class Switch Recombination and Ig Secretion to All Isotypes." *Blood* 116 (11): 1895–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>.
- Vita, Marina, and Marie Henriksson. 2006. "The Myc Oncoprotein as a Therapeutic Target for Human Cancer." *Seminars in Cancer Biology* 16 (4): 318–30.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.015>.
- Volkan Çakır, Mehmet, Henry Wirth, Arsen Arakelyan, and Hans Binder. 2017. "Dysregulated Signal Propagation in a MYC-Associated Boolean Gene Network in B-Cell Lymphoma." *Biology, Engineering and Medicine* 2 (2). <https://doi.org/10.15761/BEM.1000115>.
- WANG, YAN, JING LIU, BO HUANG, YAN-MEI XU, JING LI, LIN-FENG HUANG, JIN LIN, et al. 2015. "Mechanism of Alternative Splicing and Its Regulation." *Biomedical Reports* 3 (2): 152–58.
<https://doi.org/10.3892/br.2014.407>.
- Wasylishen, Amanda R., Michelle Chan-Seng-Yue, Christina Bros, Dharmendra Dingar, William B. Tu, Manpreet Kalkat, Pak-Kei Chan, et al. 2013. "MYC Phosphorylation at Novel Regulatory Regions Suppresses Transforming Activity." *Cancer Research* 73 (21): 6504–15.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4063>.
- Weber, J. D., J. R. Jeffers, J. E. Rehg, D. H. Randle, G. Lozano, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and G. P. Zambetti. 2000. "P53-Independent Functions of the P19(ARF) Tumor Suppressor." *Genes & Development* 14 (18): 2358–65. <https://doi.org/10.1101/gad.827300>.
- Weidensdorfer, Doreen, Nadine Stöhr, Anne Baude, Marcell Lederer, Marcel Köhn, Angelika Schierhorn, Sabine Buchmeier, Elmar Wahle, and Stefan Hüttelmaier. 2009. "Control of C-Myc mRNA Stability by IGF2BP1-Associated Cytoplasmic RNPs." *RNA (New York, N.Y.)* 15 (1): 104–15. <https://doi.org/10.1261/rna.1175909>.
- Weiner, George J. 2010. "Rituximab: Mechanism of Action." *Seminars in Hematology* 47 (2): 115–23.
<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>.
- Welcker, Markus, Amir Orian, Jianping Jin, Jonathan E. Grim, Jonathan A. Grim, J. Wade Harper, Robert N. Eisenman, and Bruce E. Clurman. 2004. "The Fbw7 Tumor Suppressor Regulates Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylation-Dependent c-Myc Protein Degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24): 9085–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402770101>.
- Whitfield, Jonathan R., and Laura Soucek. 2012. "Tumor Microenvironment: Becoming Sick of Myc." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (6): 931–34. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0860-x>.
- Wierstra, Inken, and Jürgen Alves. 2006. "FOXM1c Transactivates the Human C-Myc Promoter Directly via the Two TATA Boxes P1 and P2." *The FEBS Journal* 273 (20): 4645–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05468.x>.
- Wierstra, Inken, and Jürgen Alves. 2008. "The C-Myc Promoter: Still Mystery and Challenge." *Advances in Cancer Research* 99: 113–333. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(07\)99004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(07)99004-1).
- Wiese, Katrin E., Susanne Walz, Björn von Eyss, Elmar Wolf, Dimitris Athineos, Owen Sansom, and Martin Eilers. 2013. "The Role of MIZ-1 in MYC-Dependent Tumorigenesis." *Cold Spring*



- Harbor Perspectives in Medicine* 3 (12): a014290. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014290>.
- Wolfer, Anita, Ben S. Wittner, Daniel Irimia, Richard J. Flavin, Mathieu Lupien, Ruwanthi N. Gunawardane, Clifford A. Meyer, et al. 2010. "MYC Regulation of a 'Poor-Prognosis' Metastatic Cancer Cell State." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (8): 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914203107>.
- Wolff, G. L., D. W. Roberts, and K. G. Mountjoy. 1999. "Physiological Consequences of Ectopic Agouti Gene Expression: The Yellow Obese Mouse Syndrome." *Physiological Genomics* 1 (3): 151–63. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.1999.1.3.151>.
- Wright, S., L. F. Mirels, M. C. Calayag, and J. M. Bishop. 1991. "Premature Termination of Transcription from the P1 Promoter of the Mouse C-Myc Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (24): 11383–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11383>.
- Xia, Yang, and Xinlian Zhang. 2020. "The Spectrum of MYC Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Acta Haematologica* 143 (6): 520–28. <https://doi.org/10.1159/000505892>.
- Xiao, Qiurong, Gisela Claassen, Jingyu Shi, Susumu Adachi, John Sedivy, and Stephen R. Hann. 1998. "Transactivation-Defective c-MycS Retains the Ability to Regulate Proliferation and Apoptosis." *Genes & Development* 12 (24): 3803–8.
- Xu-Monette, Zijun Y., Qipan Deng, Ganiraju C. Manyam, Alexander Tzankov, Ling Li, Yi Xia, Xiao-xiao Wang, et al. 2016. "MYC Mutation Profiling and Prognostic Significance in de Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (14): 3593–3605. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2296>.
- Yu, Li, Tian-Tian Yu, and Ken H. Young. 2019. "Cross-Talk between Myc and P53 in B-Cell Lymphomas." *Chronic Diseases and Translational Medicine* 5 (3): 139. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2019.08.001>.
- Yuneva, Mariia, Nicola Zamboni, Peter Oefner, Ravi Sachidanandam, and Yuri Lazebnik. 2007. "Deficiency in Glutamine but Not Glucose Induces MYC-Dependent Apoptosis in Human Cells." *The Journal of Cell Biology* 178 (1): 93–105. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>.
- Zayac, Adam S., and Adam J. Olszewski. 2020. "Burkitt Lymphoma: Bridging the Gap between Advances in Molecular Biology and Therapy." *Leukemia & Lymphoma* 61 (8): 1784–96. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1747068>.
- Zhang, Huan-Le, Ping Wang, Miao-Zhen Lu, San-Dian Zhang, and Lu Zheng. 2019. "C-Myc Maintains the Self-renewal and Chemoresistance Properties of Colon Cancer Stem Cells." *Oncology Letters* 17 (5): 4487–93. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10081>.
- Zhou, Hong, Yapei Wang, Qiongying Lv, Juan Zhang, Qing Wang, Fei Gao, Haoli Hou, Hao Zhang, Wei Zhang, and Lijia Li. 2016. "Overexpression of Ribosomal RNA in the Development of Human Cervical Cancer Is Associated with RDNA Promoter Hypomethylation." *PLOS ONE* 11 (10): e0163340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163340>.
- Zhu, Katie Y., Kevin W. Song, Joseph M. Connors, Heather Leitch, Michael J. Barnett, Khaled Ramadan, Graham W. Slack, et al. 2018. "Excellent Real-World Outcomes of Adults with Burkitt Lymphoma Treated with CODOX-M/IVAC plus or Minus Rituximab." *British Journal of Haematology* 181 (6): 782–90. <https://doi.org/10.1111/bjh.15262>.
- Zindy, F., C. M. Eischen, D. H. Randle, T. Kamijo, J. L. Cleveland, C. J. Sherr, and M. F. Roussel. 1998. "Myc Signaling via the ARF Tumor Suppressor Regulates P53-Dependent Apoptosis and Immortalization." *Genes & Development* 12 (15): 2424–33. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2424>.
- Zörnig, Martin, and Gerard I Evan. 1996. "Cell Cycle: On Target with Myc." *Current Biology* 6 (12): 1553–56. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70769-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70769-0).



Résumé

L'oncogène *c-MYC* est un précieux régulateur des gènes qui régissent plusieurs fonctions cellulaires vitales comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, ce qui rend sa dérégulation périlleuse pour le destin cellulaire. Il est impliqué dans la majorité des cancers (solides et hématopoïétiques) et sa surexpression constitue une indication de mauvais pronostic. La structure du gène *c-MYC* (3 exons et 4 promoteurs P0, P1, P2 et P3) illustre la multitude des mécanismes de régulation qui aboutissent à différentes protéines synthétisées. A ce jour, il est bien établi que l'expression de *c-MYC* peut conduire à trois isoformes, *c-Myc1/P67*, *c-Myc2/P64*, *c-MycS/P55* qui se différencient par leur région N-terminale et sont produites dans des proportions différentes. Un mécanisme de balayage avec fuite (*leaky scanning*), à partir du même ARNm, à des codons d'initiation alternatifs (CUG, AUG et AUG) est considéré comme une interprétation de l'existence de ces isoformes. Cependant, la proportion de protéines *c-Myc* change en fonction de l'état de prolifération de la cellule, mais aussi en fonction des promoteurs utilisés. En effet, un « shift » P2/P1 a été observé dans les lymphomes B issus de translocations juxtaposant le gène *c-MYC* à de puissants éléments activateurs, comme dans le lymphome de Burkitt. L'objectif de nos recherches visait à approfondir les mécanismes de l'effet du « shift » de promoteur sur l'expression et la répartition des protéines *c-Myc* dans les lymphomes B. Nous avons détecté dans un modèle murin qui développe un lymphome de Burkitt lié à la présence d'un transgène de *c-MYC* issu des cellules BL60 (translocation t(8;22)), et dans des lignées cellulaires de lymphomes B humains, des transcrits qui ont une hétérogénéité à l'extrémité 5'. Ces variants distincts pourraient être à l'origine de l'expression accrue d'une isoforme (*c-Myc2* et/ou *c-MycS*) par rapport aux autres isoformes dans les cellules tumorales. Nous avons également utilisé un modèle de traduction de protéines *in vitro* qui nous a permis de confirmer le produit protéique de *c-MYC*. Finalement, notre étude suggère un autre moyen d'expression de *c-MYC* adopté, au cours de la lymphomagenèse, par les cellules cancéreuses "dépendantes" de *c-MYC* comme dans la lignée BL60 pour proliférer.

Mots-clés : dérégulation de *c-MYC*, traduction, isoformes, 5'UTR, lymphome de Burkitt.

Abstract

c-MYC oncogene is a key regulator of genes that govern several vital cellular functions, proliferation, differentiation, apoptosis, etc., making its deregulation perilous for the cell fate. It is involved in almost all cancers (solid and hematopoietic) and its overexpression is associated with poor prognosis. The structure of the *c-MYC* gene (3 exons and 4 promoters P0, P1, P2 and P3) illustrates the multitude of regulatory mechanisms and the diversification of the synthesized proteins. To date, it is recognized that *c-MYC* gives rise to three isoforms, *c-Myc1/P67*, *c-Myc2/P64*, *c-MycS/P45*, which are differentiated by their N-terminal region and are produced in different proportions. A leaky scan mechanism from the same mRNA to alternative start codons (CUG, AUG and AUG) is considered as an interpretation of the origin of these isoforms. However, the proportion of *c-Myc* protein changes according to the cell proliferative state, but also in function of the promoter used. Indeed, a shift P2/P1 has been observed in B lymphomas resulting from translocations juxtaposing the *c-MYC* gene with strong activating elements, as in Burkitt's lymphoma. Our research was focused on the effect of promoter shift on the expression and distribution of *c-Myc* proteins in B-cell lymphoma, notably Burkitt lymphoma. We have detected in our mouse model of Burkitt lymphoma carrying the t(8;22) *c-MYC* translocation from BL60 cells, and in human lymphoma B-cell lines, transcripts that have heterogeneity at the 5' end region. These distinct variants could underlie the increased expression of one isoform (*c-Myc2* and/or *c-MycS*) relative to other isoforms in tumor cells. We also used *in vitro* protein translation model that allowed us to confirm the protein product of *c-MYC*. Taken together, our studies show an alternative way of expression of *c-MYC* adopted, during lymphomagenesis, by cancer cells "dependent" on *c-MYC*, like the BL60 Burkitt lymphoma cell line, for proliferation.

Keywords : *c-MYC* deregulation, isoforms, translation, 5' UTR, Burkitt's lymphoma.



Résumé

L'oncogène *c-MYC* est un précieux régulateur des gènes qui régissent plusieurs fonctions cellulaires vitales comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, ce qui rend sa dérégulation périlleuse pour le destin cellulaire. Il est impliqué dans la majorité des cancers (solides et hématopoïétiques) et sa surexpression constitue une indication de mauvais pronostic. La structure du gène *c-MYC* (3 exons et 4 promoteurs P0, P1, P2 et P3) illustre la multitude des mécanismes de régulation qui aboutissent à différentes protéines synthétisées. A ce jour, il est bien établi que l'expression de *c-MYC* peut conduire à trois isoformes, *c-Myc1/P67*, *c-Myc2/P64*, *c-MycS/P55* qui se différencient par leur région N-terminale et sont produites dans des proportions différentes. Un mécanisme de balayage avec fuite (*leaky scanning*), à partir du même ARNm, à des codons d'initiation alternatifs (CUG, AUG et AUG) est considéré comme une interprétation de l'existence de ces isoformes. Cependant, la proportion de protéines *c-Myc* change en fonction de l'état de prolifération de la cellule, mais aussi en fonction des promoteurs utilisés. En effet, un « shift » P2/P1 a été observé dans les lymphomes B issus de translocations juxtaposant le gène *c-MYC* à de puissants éléments activateurs, comme dans le lymphome de Burkitt. L'objectif de nos recherches visait à approfondir les mécanismes de l'effet du « shift » de promoteur sur l'expression et la répartition des protéines *c-Myc* dans les lymphomes B. Nous avons détecté dans un modèle murin qui développe un lymphome de Burkitt lié à la présence d'un transgène de *c-MYC* issu des cellules BL60 (translocation t(8;22)), et dans des lignées cellulaires de lymphomes B humains, des transcrits qui ont une hétérogénéité à l'extrémité 5'. Ces variants distincts pourraient être à l'origine de l'expression accrue d'une isoforme (*c-Myc2* et/ou *c-MycS*) par rapport aux autres isoformes dans les cellules tumorales. Nous avons également utilisé un modèle de traduction de protéines *in vitro* qui nous a permis de confirmer le produit protéique de *c-MYC*. Finalement, notre étude suggère un autre moyen d'expression de *c-MYC* adopté, au cours de la lymphomagenèse, par les cellules cancéreuses "dépendantes" de *c-MYC* comme dans la lignée BL60 pour proliférer.

Mots-clés : dérégulation de *c-MYC*, traduction, isoformes, 5'UTR, lymphome de Burkitt.

Abstract

c-MYC oncogene is a key regulator of genes that govern several vital cellular functions, proliferation, differentiation, apoptosis, etc., making its deregulation perilous for the cell fate. It is involved in almost all cancers (solid and hematopoietic) and its overexpression is associated with poor prognosis. The structure of the *c-MYC* gene (3 exons and 4 promoters P0, P1, P2 and P3) illustrates the multitude of regulatory mechanisms and the diversification of the synthesized proteins. To date, it is recognized that *c-MYC* gives rise to three isoforms, *c-Myc1/P67*, *c-Myc2/P64*, *c-MycS/P45*, which are differentiated by their N-terminal region and are produced in different proportions. A leaky scan mechanism from the same mRNA to alternative start codons (CUG, AUG and AUG) is considered as an interpretation of the origin of these isoforms. However, the proportion of *c-Myc* protein changes according to the cell proliferative state, but also in function of the promoter used. Indeed, a shift P2/P1 has been observed in B lymphomas resulting from translocations juxtaposing the *c-MYC* gene with strong activating elements, as in Burkitt's lymphoma. Our research was focused on the effect of promoter shift on the expression and distribution of *c-Myc* proteins in B-cell lymphoma, notably Burkitt lymphoma. We have detected in our mouse model of Burkitt lymphoma carrying the t(8;22) *c-MYC* translocation from BL60 cells, and in human lymphoma B-cell lines, transcripts that have heterogeneity at the 5' end region. These distinct variants could underlie the increased expression of one isoform (*c-Myc2* and/or *c-MycS*) relative to other isoforms in tumor cells. We also used *in vitro* protein translation model that allowed us to confirm the protein product of *c-MYC*. Taken together, our studies show an alternative way of expression of *c-MYC* adopted, during lymphomagenesis, by cancer cells "dependent" on *c-MYC*, like the BL60 Burkitt lymphoma cell line, for proliferation.

Keywords : *c-MYC* deregulation, isoforms, translation, 5' UTR, Burkitt's lymphoma.

